Thesis LEIDEN 1964

AGGLUTINATOREN EN REMMERS IN DE LATEX-FIXATIEPROEF

F. KLEIN

AGGLUTINATOREN EN REMMERS IN DE LATEX-FIXATIEPROEF

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR. D. J. KUENEN, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN, TEN OVERSTAAN VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 7 OKTOBER 1964 TE 14.00 UUR

DOOR

FRANK KLEIN
GEBOREN TE 'S-GRAVENHAGE IN 1924

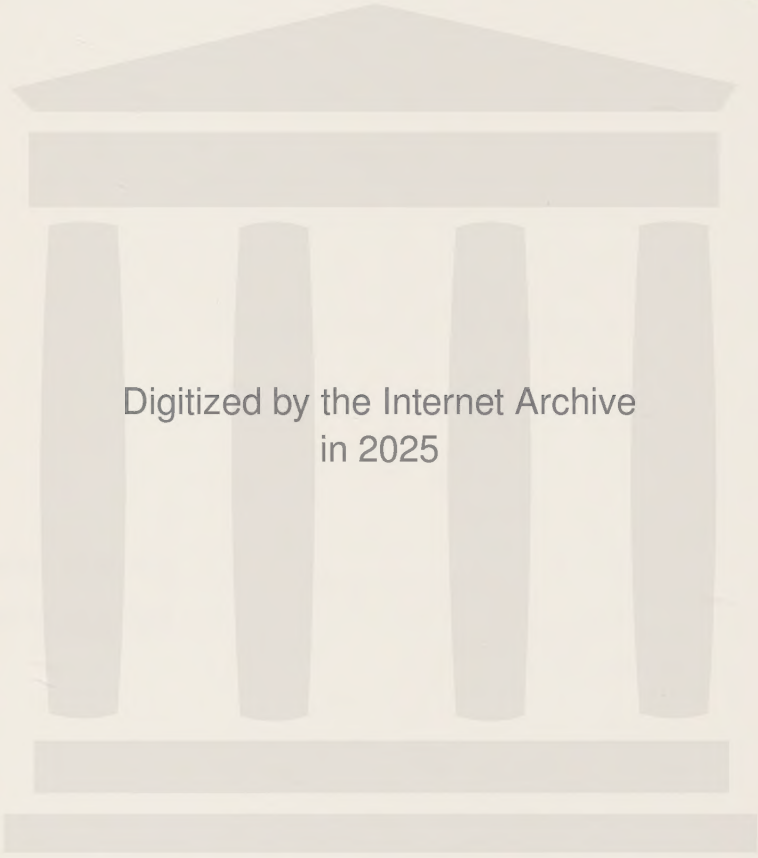
DRUCO DRUKKERIJBEDRIJVEN - LEIDEN

Promotor: Prof.Dr. H. Veldstra

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd verricht in het Serologisch Laboratorium (Dr. H.A. Valkenburg) en de Immunologische Afdeling (Dr. W. Hijmans) van het Instituut voor Rheumaonderzoek van de Stichting Rheumatologische Kliniek te Leiden (Prof.Dr. J. Goslings).

Aan mijn ouders

Aan mijn vrouw


Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/agglutinatorenen0000fkli

I N H O U D

blz.

HOOFDSTUK I INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING 7

1. Rheumatoïde-Arthritisfactor en substraat 7
2. Reactiepatronen bij de latex-fixatieproef 10

HOOFDSTUK II DE LATEX-FIXATIEPROEF 15

1. Inleiding 15
2. Stabilisatie van het latexproefsysteem 15
3. Het latexproefsysteem in reducerend milieu 21

HOOFDSTUK III ISOLERING EN ONDERZOEK VAN THERMOSTABIELE AGGLUTINERENDE FRACTIES BIJ NEGATIEVE SERA 24

1. Inleiding 24
2. Materiaal en methoden 25
   2.1. Analytische ultracentrifugering 25
   2.2. Immunologische technieken 25
   2.3. Preparatieve electrophorese 25
   2.4. Materiaal 26
3. Isolering van macroglobulinefracties met behulp van preparatieve ultracentrifugering 26
   3.1. Centrifugering van totaal serum 26
   3.2. Gradiëntcentrifugering 28
   3.3. Verbeterde methode van gradiëntcentrifugering 30
4. Euglobulinefractioneringen 31
5. Isolering van macroglobulinefracties door gelfiltratie 33
   5.1. Inleiding en voorproeven 33
   5.2. Modelproeven met pathologische sera 34
   5.3. Proeven met na inactivering positieve sera 36
6. Isolering van agglutinerende fracties met behulp van preparatieve electrophorese 41
7. Chromatografische scheidingen 43
8. Discussie 45

blz.

HOOFDSTUK IV REMMERS VAN DE LATEX-FIXATIEPROEF 47

1. Inleiding 47
2. Proefopstelling 48
3. Mechanisme van de remming 49
   3.1. Inleiding 49
   3.2. Binding van de remmer aan het latex-γ-globulinecomplex 49
   3.3. Binding van de remmer aan het latex-γ-globuline-R.A. factorcomplex 52
4. De aard van de remmer 53
   4.1. Inleiding 53
   4.2. Binding van de remmer aan antigeen-antilichaamcomplexen 55
   4.3. Binding van het complement aan het latex-γ-globulinecomplex 56
   4.4. Binding van het complement aan het latex-γ-globuline-R.A. factorcomplex 58
   4.5. Inactivering van de verschillende componenten van het complementsysteem 60
5. Discussie 63

HOOFDSTUK V ISOLERING EN ONDERZOEK VAN EEN THERMOLABIELE AGGLUTINERENDE FRACTIE 66

1. Inleiding 66
2. Isolering van de agglutinerende factor 67
3. Verdere karakterisering van de agglutinerende factor 70
4. Het verband van de agglutinerende factor met het complementsysteem 73
5. Discussie 75

SAMENVATTING EN CONCLUSIES 77

SUMMARY 80

LITTERATUUR 82

HOOFDSTUK I

INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING

1. Rheumatoïde-Arthritisfactor en substraat

Bij het stellen van de diagnose rheumatoïde arthritis kan gebruik worden gemaakt van verschillende serologische proeven, die berusten op de reactie van een serumbestanddeel met veranderd menselijk of dierlijk 7 S γ-globuline. Dit veranderde γ-globuline kan zich in oplossing bevinden of op het oppervlak van gesuspendeerde deeltjes, hetzij gebonden door adsorptie (b.v. polystyreenlatex, 65, of getanneerde erythrocyten van schaap of mens, 37), hetzij door een antigeen-antilichaamreactie. Deze laatste vorm, de Waaler-Roseproef, is voor het eerst beschreven door Waaler in 1940 (73) en pas later als een anti-γ-globulinereactie geïnterpreteerd. De verandering van het γ-globuline wordt in de oplossing teweeg gebracht door een korte verhitting, die enige denaturering veroorzaakt. Op het oppervlak van de genoemde deeltjes treedt ook een vormverandering van de moleculen op, door de spreiding bij adsorptie of door de reactie met het antigeen op het deeltje. Bij de Waaler-Roseproef wordt dierlijk γ-globuline, gewoonlijk van konijnen, als substraat voor de reactie gebruikt; bij de andere proeven menselijk γ-globuline, meestal in de vorm van Cohn's fractie F II. Figuur 1 geeft deze reacties schematisch weer.

Het serumbestanddeel dat met het 7 S γ-globuline reageert, is in 1957 door Franklin e.a. (24) geïdentificeerd als een β_2-macroglobuline, met een sedimentatieconstante van 19 S. Dit β_{2M}-globuline* is in physisch-chemisch opzicht niet te onderscheiden van de andere eiwitten in deze fractie, maar heeft de kenmerkende eigenschap met 7 S γ-globuline te kunnen reageren in één of meer

* In het vervolg wordt dit de R.A. (Rheumatoïde Arthritis) factor genoemd.

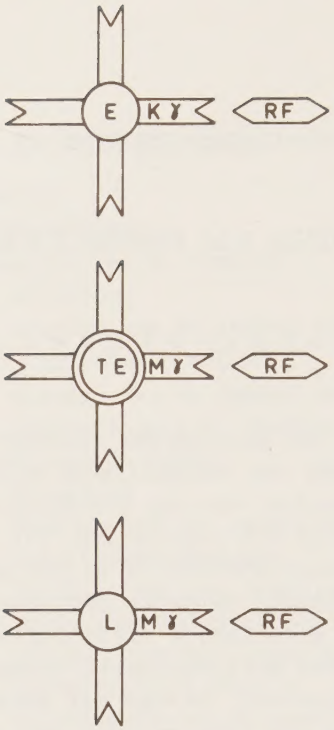


Fig. 1

Mechanisme van agglutinatiereacties voor het aantonen van de R.A. factor.

E = erythrocyt
TE = getanneerde erythrocyt
L = latexdeeltje
Kγ = konijnen-γ-globuline
Mγ = menselijk γ-globuline
RF = R.A. factor

van de bovengenoemde systemen. Er kan een neerslag met een oplossing van gedenatureerd γ-globuline worden gevormd, of een oplosbaar complex met 7 S γ-globuline (het 22 S complex van Franklin e.a.), en ook kan er een agglutinatie plaatsvinden in een van de bovengenoemde systemen. Verder onderzoek heeft aangetoond dat er meerdere R.A. factoren zijn, sommige gericht tegen menselijk γ-globuline, andere tegen dierlijk γ-globuline of tegen beide (Milgrom, 53, Heimer, 33). De z.g. vals positieve sera, afkomstig van personen die niet lijden aan een van de collageenziekten, zouden vooral met menselijk γ-globuline reageren; de positieve R.A. sera zowel met menselijk als dierlijk γ-globuline (7). Intussen zijn er ook vals positieve sera gevonden die alleen met

dierlijk γ-globuline reageren (4, 43). In het algemeen schijnen de vals positieve sera een meer beperkte specificiteit ten aanzien van hun substraat te hebben dan de R.A. sera (Fudenberg en Kunkel, 28).

De R.A. factoren behoren met de andere ρ_{2M}-globulinen tot de groep der immuunglobulinen. Men heeft de reacties met veranderd γ-globuline dan ook willen zien als antigeen-antilichaamreacties, die het gevolg zouden kunnen zijn van auto-immunisatieprocessen, zoals die ook bij andere collageenziekten aangenomen worden (17). Voor het antilichaamkarakter van de R.A. factor pleiten verder nog verschillende eigenschappen zoals onder andere thermostabiliteit en heterogeniteit (47). Dit laatste blijkt o.a. uit de afwezigheid van een scherp begrensde ρ_{2M}-band in de agarelectrophorese, zoals die voorkomt bij paraproteïnaemieën, maar niet bij reactieve macroglobulinaemieën (Mattern e.a., 52). Men kan zich voorstellen dat door een ontregeling van het immunologische afweermechanisme het eigen γ-globuline tot antigeen wordt. De reacties met dierlijk γ-globuline zouden dan als kruisreacties op te vatten zijn (zie ook Aho, 2). Een andere opvatting is dat de R.A. factor een antilichaam is tegen het γ-globulinedeel van antigeen-antilichaamcomplexen, waarbij het antigeen van endogene of exogene oorsprong kan zijn. Zulke complexen kunnen de R.A. factor uit serum adsorberen (72), terwijl inspuiting ervan aanleiding kan geven tot het ontstaan van R.A. factorachtige antilichamen. Het γ-globuline is in deze gevallen veranderd, niet door denaturering, maar door de reactie met een antigeen, waardoor het zelf op zijn beurt een antigeen kan worden. Eyquem e.a. (19) en later Abruzzo en Christian (1) konden door langdurige immunisatie met bepaalde bacteriën bij konijnen reacties in het serum opwekken, die analoog waren aan die van de R.A. factor. Aan Aho en Wager (3) lukte dit ook met eiwitantigenen en met antigeen-antilichaamcomplexen. Men stelt zich voor dat bij deze proeven het aan de bacteriën of aan de gezuiverde eiwitantigenen gebonden γ-globuline als antigeen optreedt. Het optreden van de R.A. factor zou dan een secundair verschijnsel zijn, dat men ook kan verwachten bij verschillende chronische infectieziekten, althans indien men aanneemt dat bij deze ziekten antigeen-antilichaamcomplexen langdurig circuleren. Een sprekend voorbeeld hiervan is de subacute bacteriële endocarditis (Williams en Kunkel, 77), waarbij het bacteriële antigeen telkens in de circulatie wordt gebracht en die daardoor een zekere overeenkomst vertoont met het experimentele model van Eyquem en van Abruzzo en Christian. De suggestie, dat hierbij de

circulatie van het bacteriële antigeen een rol speelt, wordt hier versterkt door de waarneming, dat na genezing van de patiënten de sera weer negatief gaan reageren. Een ander voorbeeld is de slaapziekte (Klein en Mattern, 43), waarbij een langdurige infectie samengaat met het eveneens langdurig optreden van β_{2M}-antilichamen in zeer hoge concentraties en met het voorkomen van een R.A. factor. Vele andere ziekten zijn in dit verband genoemd (7), maar aan de andere kant is het optreden bij infectieziekten niet algemeen, terwijl ook ziekten van niet-infectieuze aard, zoals de macroglobulinaemie van Waldenström, veel vals positieven zouden opleveren (Hammack en Holley, 32). Laatstgenoemde ziekte wordt onder meer gekenmerkt door een zeer hoog gehalte aan β_{2M}-globulinen in het serum, welke globulinen meestal geen aanwijsbare antilichaamactiviteit hebben. In enkele gevallen wordt vermeld dat deze z.g. paraproteïnen de eigenschappen van een R.A. factor zouden hebben (Kritzman e.a., 46). Het is dus nog geenszins bewezen dat de R.A. factor inderdaad als een antilichaam tegen antigeen-antilichaamcomplexen moet worden opgevat. Voor een recent overzicht over de R.A. factor kan verwezen worden naar een artikel van Christian (13).

2. Reactiepatronen bij de latex-fixatieproef

In 1957 beschreven Singer en Plotz (65) een agglutinatieproef, waarbij de erythrocyt als drager van γ-globuline vervangen was door een biologisch inerte drager bestaande uit polystyreenbolletjes van één bepaalde grootte. Deze deeltjes kunnen γ-globuline uit een oplossing op hun oppervlakte adsorberen (zie ook Oreskes en Singer, 58), en vervolgens door ongeveer 70 % van de R.A. sera worden geagglutineerd. Door Valkenburg en de Mos (70) werd een gewijzigde proef opgezet, waarvan de bijzonderheden in hoofdstuk II beschreven worden. Zij gingen ook de invloed na van verschillende variabelen zoals o.a. voorafgaande verhitting van het serum, en de temperatuur waarbij het mengsel van serum en met γ-globuline beklede latex wordt geïncubeerd. Sommige van hun waarnemingen lijken een meer dan louter technische betekenis te hebben en zouden van belang kunnen zijn bij beschouwingen over aard en ontstaan van de R.A. factor. Enkele voor ons onderzoek relevante uitkomsten zijn in Tabel I weergegeven.

Tabel I

Verschillende reactiepatronen bij de latex-fixatieproef

Aard van het serum	Reciproke serumverdunningen									
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
A. Normaal serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1. in 75% van de gevallen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. in 13% van de gevallen	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-
3. in 10% van de gevallen	±	(±)	1	2	1	(+)	-	-	-	-
4. in 2% van de gevallen	3	3	2	2	2	1	1	1	±	-
B. Normaal serum (als onder A.) na verhitten op 56°C gedurende een half uur										
1. in 38% van de gevallen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. in 37% van de gevallen	2	2	1	±	-	-	-	-	-	-
3. in 23% van de gevallen (titers hoger dan bij B.2.)	3	2	2	2	2	1	-	-	-	-
4. in 2% van de gevallen	3	3	2	2	2	2	1	1	±	-
C. Sera van patienten lijdende aan rheumatoide arthritis										
1. zonder verhitting op 56°C	4	3	3	3	3	2	2	2	2	2
2. na verhitting op 56°C	4	3	3	3	3	2	2	2	2	2
D. Normaal serum (als A.1.-3.) na 2 uur incubatie op 37°C of op kamertemperatuur	3	3	2	2	2	1	-	-	-	-

Vooruitlopende op de beschrijving van de proef in hoofdstuk II.2 wordt opgemerkt dat de cijfers de mate van agglutinatie weergeven in de 10 opeenvolgende verdunningen waarin de proef wordt uitgevoerd. De hier gegeven percentages zijn slechts voorbeelden, afkomstig uit één bepaald onderzoek en zonder algemene geldigheid.

Drie verschijnselen vallen op bij het beschouwen van deze tabel:

1e. Na voorafgaande verhitting van het te onderzoeken serum gedurende 30′ op 56° C*, wordt ongeveer 60 % van de normale, negatieve sera (agglutinatiepatronen sub A 1, 2, 3) positief, zij het ook in lage titer, d.w.z. < 1/640. Dit verschijnsel wordt alleen goed zichtbaar bij gebruik van glycinebuffer. Bij de ook wel voor dit soort proeven gebruikte boraatbuffer is het nauwelijks te zien.

2e. Een z.g. prozoneverschijnsel kan optreden (b.v. zoals bij A 2, 3), hierin bestaande dat de hoeveelheid neerslag per buis bij toenemende verdunning eerst toeneemt alvorens uiteindelijk te verminderen en te verdwijnen. Na voorafgaande verhitting gedurende 30′ op 56° C worden deze sera positief, zoals bij B 2, 3.

3e. Bij incubatie van het reactiemengsel : serum + latex-γ-globuline bij een temperatuur $\leqslant$ 37° C in plaats van 56° C zoals gewoonlijk in de latexproef wordt gedaan, worden alle sera positief (agglutinatiepatroon sub D). Bij sera die na een incubatie op 56° C negatief zijn, is deze agglutinatie een langzaam verlopende reactie, anders dan de agglutinatie van de echte R.A. sera, die vlugger verloopt (71).

Deze drie waarnemingen werpen verschillende vragen op:

ad 1 Is de agglutinatie veroorzaakt door normale sera na voorafgaande verhitting, te vergelijken met de reactie die veroorzaakt wordt door de R.A. factor? Men zou zich kunnen voorstellen dat door de verhitting artefacten worden gevormd, die de genoemde reactie veroorzaken. Het is echter ook denkbaar dat door de verhitting een thermolabiele remmer buiten werking gesteld wordt. Het belang van deze vraag

* Veelal inactivering genoemd naar een werkwijze om complement te inactiveren. Deze term wordt in dit proefschrift aangehouden.

ligt in het feit dat, wanneer deze reactie inderdaad door β_{2M}-globulinen wordt veroorzaakt, de R.A. factor, of althans bepaalde R.A. factoren veel meer voorkomen dan tot nu toe werd aangenomen. Men kan dan twee veronderstellingen maken:
1e. auto-immunisatieprocessen komen, zij het in geringe mate, zeer algemeen voor.
2e. de R.A. factor ontstaat door een exogene oorzaak. Deze gedachte komt vooral naar voren wanneer men de R.A. factor als een antilichaam tegen antigeen-antilichaamcomplexen beschouwt, die ook bij gezonden in geringe mate circuleren en dan als antigeen zouden kunnen optreden. In beide gevallen zou het bijzondere karakter van de R.A. factor meer van quantitatieve dan van qualitatieve aard kunnen zijn. De waarneming van Valkenburg (71) dat de na inactivering optredende positieve reacties niet bij pasgeborenen worden gevonden, wijst ook in deze richting en suggereert tevens dat we hier inderdaad met een macroglobuline te maken hebben. Aanwijzingen voor het voorkomen van R.A. factorachtige agglutinatoren bij negatieve sera zijn hier en daar in de litteratuur te vinden. Zo veronderstelde Gray (30) het bestaan van een dergelijke factor, en ook Müller-Eberhard (55) en Heimer e.a. (34) vonden aanwijzingen voor het bestaan van agglutinatoren met een 19 S karakter bij normale negatieve sera. Ook Watson (74) vond dergelijke factoren na een euglobulinefractionering van normale sera.

ad 2 Wordt de onder 1 genoemde reactie inderdaad door een reeds vóór de verhitting aanwezige serumfactor veroorzaakt, dan komt meteen de vraag naar de aard van de thermolabiele remmer naar voren. De mogelijkheid bestaat dat deze dezelfde is als de remmer die het prozoneverschijnsel veroorzaakt, zodat het verschil tussen prozone-sera en na inactivering positieve sera slechts van quantitatieve aard zou zijn. Het voorkomen van de remmer zou misschien een biologische betekenis kunnen hebben zodat het van belang lijkt een poging tot nadere karakterisering van dit bestanddeel te wagen.

In de litteratuur zijn verschillende meningen over deze inhibitor uitgesproken. Sommigen (Brine e.a., 11, en Schubart, 62) schrijven het effect toe aan bepaalde bestanddelen van het complementsysteem. Singer e.a. (66) spreken van een

aspecifiek effect in de zin van een stabilisering van de latexsuspensie door een als "beschermcolloid" fungerend eiwit.

ad 3 Bij incubatie van de latexproef op 37° C of kamertemperatuur treden agglutinaties op die niet specifiek zijn voor enig ziektebeeld. De specificiteit wordt alleen verkregen, wanneer het reactiemengsel op 56° C wordt verhit. Als deze agglutinatoren verwant zouden zijn, dan zou de specificiteit van de latexproef alleen maar afhangen van de temperatuur waarbij de reactie wordt uitgevoerd. Men kan zich dan afvragen waar precies de grens ligt van de specificiteit van de R.A. factor. Is er bij de agglutinaties $\leqslant$ 37° C daarentegen sprake van een geheel ander systeem dan komt juist de betrekkelijke specificiteit van de R.A. factor wat duidelijker naar voren. De vraag of dit andere systeem eveneens bij de immuunglobulinen thuis hoort, blijft ook dan interessant. Immers wanneer dit zo zou zijn, zou dat betekenen dat auto-immunisatie tegen γ-globuline bij mensen altijd optreedt.

In dit proefschrift zal getracht worden op deze drie vragen een antwoord te vinden. Nadat in hoofdstuk II eerst nader op de latexfixatieproef is ingegaan, zullen in de hoofdstukken III, IV en V achtereenvolgens experimenten betreffende de positieve reacties na voorafgaande verhitting, de inhibitoren en de agglutinaties bij 37° C besproken worden.

HOOFDSTUK II

DE LATEX-FIXATIEPROEF

1. Inleiding

In dit hoofdstuk zullen enkele modificaties van de latex-fixatieproef worden behandeld, die bij het in dit proefschrift beschreven onderzoek worden gebruikt. In het bijzonder betreft het hier pogingen tot stabilisatie van de latexproef, en een uitvoering van de proef in reducerend milieu. Enkele conclusies die direct uit deze experimenten volgen, zullen, vooruitlopende op een uitgebreidere bespreking van de gestelde vragen in de volgende hoofdstukken, reeds hier worden genoemd.

2. Stabilisatie van het latexproefsysteem

Aanvankelijk werd de proefopstelling gebruikt die door Valkenburg en de Mos (70) is beschreven. Dit systeem onderscheidt zich van de veelal gebruikte uitvoering volgens Singer en Plotz (65), doordat na de incubatie bij 56° C niet meteen wordt gecentrifugeerd, maar de buizen eerst ongeveer 20 uur bij kamertemperatuur blijven staan. Dit heeft een grotere gevoeligheid ten gevolge, die het mogelijk maakt om ook zwakke effecten waar te nemen. Eerst volgt nu een beschrijving van de proef volgens Valkenburg en de Mos.

Als buffer wordt gebruikt 0,1 M glycine-NaOH buffer van pH = 8,2 die 0,585 % NaCl bevat. Deze wordt in het vervolg aangeduid als standaardbuffer.
De latex-γ-globuline-suspensie wordt als volgt gemaakt:
Aan 0,1 ml Difco Bacto Latex (0,81 μ) wordt achtereenvolgens toegevoegd 0,5 ml van een 0,5 % γ-globulineoplossing in standaardbuffer en 9,44 ml standaardbuffer. Het is essentieel deze volgorde aan te houden. De γ-globulineoplossing wordt door verdunning met standaardbuffer gemaakt uit een 16 % oplossing die betrokken wordt

van het Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusiedienst van het Nederlandse Rode Kruis te Amsterdam.
In buizen van 0,8 cm inwendige diameter en 7,5 cm lengte wordt van het te onderzoeken serum een tweevoudige verdunningsreeks van 10 gemaakt, te beginnen met een verdunning van 1/20 (d.w.z. 1,9 ml standaardbuffer en 0,1 ml serum). Iedere buis bevat 1 ml van een verdunning, waaraan 1 ml van de latex-γ-globuline-suspensie wordt toegevoegd. De buizen worden dan 1½ uur in een waterbad op 56° C en daarna 20 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd. Vlak voor het aflezen wordt gedurende 3 minuten bij 2300 t/min. (1200 g) gecentrifugeerd. De agglutinaties worden met het blote oog, zonder van te voren opschudden beoordeeld en als volgt gewaardeerd:

-	geen agglutinatie
±	nauwelijks zichtbare agglutinatie
(+)	een onvolledig gevormde ring van neerslag
1	een volledige neerslagring
2 t/m 4	toenemende hoeveelheden neerslag, met steeds helderder worden van de bovenstaande vloeistof.

De uitkomsten worden steeds als een breuk aangegeven, waarvan de noemer de laatste verdunning (titer) voorstelt waarbij nog agglutinatie optreedt, terwijl de teller gevormd wordt door optelling van de waarderingscijfers van de agglutinaties in alle buizen; dus het patroon 222111(+)--- (toenemende verdunning van links naar rechts geschreven) wordt 9/640.

Van een prozone wordt gesproken wanneer deze waarderingscijfers bij toenemende verdunning eerst toenemen: b.v. -(+)121(+)----. Een serum wordt "klinisch positief" genoemd wanneer bij een agglutinatie van tenminste 2 per buis de titer van 640 wordt overschreden. Prozones worden negatief gerekend. Deze keuze wordt uitsluitend gedaan met het oogmerk zoveel mogelijk positieve uitkomsten in de groep rheumatoïde arthritis te laten vallen en zo weinig mogelijk in de controlegroep. Bij het leggen van de grens op deze plaats bleken ongeveer 70% van de lijders aan rheumatoïde arthritis positief te reageren, terwijl het percentage vals positieven, afhankelijk van de groep onderzochte sera, 2 tot 4% bedroeg. Voor het te beschrijven onderzoek speelt deze grens natuurlijk geen grote rol: ook de eronder liggende sera reageren wel degelijk. In dit proefschrift zal met positief dan ook bedoeld worden serologisch positief zonder prozone, niet klinisch positief.

Op drie punten dient nog de aandacht te worden gevestigd. De glycinebuffer is voor het goed waarnemen van de na inactivering optredende reacties (zie hoofdstuk I) essentieel. Met de ook wel voor de latexproef gebruikte boraatbuffer komt dit effect niet of nauwelijks te voorschijn. Een verklaring hiervoor is voorlopig niet te geven. Verder is het nodig het reactiemengsel een lange

tijd te laten staan om de besproken effecten te kunnen zien. Tenslotte is het voor het waarnemen van geringe effecten nodig om het bij deze proef veelal gebruikelijke opwervelen van het neerslag na te laten. De reden hiervoor is dat het neerslag zeer fijn is en de deeltjes los gebonden zijn, zodat het sediment bij opwervelen gemakkelijk los geschud kan worden. Klinisch sterk positieve sera daarentegen vertonen een veel grovere en hechtere agglutinatie. Ook zonder dat geschud wordt, kunnen door het invoegen van controleproeven valse agglutinaties als zodanig worden herkend.

Nadat gedurende enige jaren op het Instituut voor Rheuma-onderzoek te Leiden op zeer reproduceerbare wijze met deze proefopstelling was gewerkt, begon in 1961 de gebruikte Difco Bacto Latex 0,81 μ valse agglutinaties te geven in de controlebuizen zonder serum. In aanwezigheid van serum was dit vooral in de grotere verdunningen hinderlijk, waarschijnlijk omdat in de eerste verdunningen een stabiliserende werking wordt uitgeoefend door bepaalde serumeiwitten. Door deze neiging tot spontaan agglutineren werden alle titers hoger, prozone effecten verdwenen, terwijl ook negatieve sera schijnbaar positieve reacties gingen geven. Hierdoor was het niet goed mogelijk de gewoonlijk vrij zwakke agglutinatie die na inactivering optreedt, te onderscheiden van valse agglutinaties, terwijl ook de proeven voor diagnostische doeleinden niet meer uitvoerbaar waren. De oorzaak hiervan was een verminderde stabiliteit van de Difco Latexsuspensie, vermoedelijk door een verandering in de fabricage in combinatie met een verslechtering van de suspensie door overmatig schudden tijdens het transport (71).

Getracht werd nu door stabilisatie van de latexsuspensie met runderalbumine (Poviet gedroogd bovine albumine) en door verandering van de latexconcentratie de proef weer bruikbaar te maken. Hierbij werd in de eerste plaats gestreefd naar het reproduceren van vroeger gevonden titers en prozones. Van bij -20° C bewaarde sera uit het archief, van verschillende titers met en zonder prozone, werden hiertoe de agglutinatiepatronen bij verschillende latex- en albumineconcentraties vergeleken met de vroeger gevonden waarden. Hierbij bleek allereerst, dat de veel gebruikte transmissie van de latexsuspensie bij 650 mμ geen geschikte maat was voor het verkrijgen van reproduceerbare uitkomsten, maar dat beter met het volumenpercentage van de oorspronkelijke Difco sus-

pensie in het latex-γ-globulinemengsel gewerkt kon worden. In het algemeen had verlaging van het latexpercentage een accentuering van het prozoneverschijnsel tot gevolg, terwijl verhoging van de albumineconcentratie de titers deed teruglopen. Door deze twee grootheden te variëren kon de proef zo ingesteld worden dat de oude waarden weer werden teruggevonden. De beste overeenstemming werd gevonden met 0,6 % latex in het latex-γ-globulinemengsel en 0,4 % runderalbumine in de buffer. Het is hierbij essentiëel dat de γ-globulineoplossing eerst bij de latex wordt toegevoegd, voordat met de albumine-houdende buffer wordt verdund. Doet men dit niet dan wordt eerst albumine aan de latexdeeltjes geadsorbeerd, waarna geen agglutinatie meer mogelijk is (zie ook Singer e.a., 66).

De standaarddeviatie van de noemer van de breuk die de uitkomst aangeeft (dus de laatste verdunning, waarin agglutinatie optreedt), werd voor de gewijzigde proef berekend uit duplo waarnemingen van 19 sera volgens de formule:

$$S = \pm\sqrt{\frac{d^2}{2k}},$$

waarin k = aantal sera en d = aantal buizen verschil in aflezing tussen de 2 proeven. Gevonden werd S = ± 0,49 wat nog wel een bruikbare proef geeft in vergelijking met de vroeger gevonden waarde van ± 0,3. Ook het prozoneverschijnsel kon bevredigend worden teruggevonden. De vermindering van de hoeveelheid latex per proefbuis maakt de aflezingen wel iets minder duidelijk, wat zich vooral bij lage titers doet gevoelen. Het was daarom soms moeilijk om zwakke agglutinaties van na inactivering positieve sera terug te vinden in bepaalde fracties waarin ze werden verwacht. Daarom werd nog een serie proeven gedaan om de invloed van latex- en albumineconcentratie op titer en prozone van sera met lage titers na te gaan, ditmaal zonder rekening te houden met aansluiting bij vroeger gevonden waarden. Van enkele sera die na inactivering positief waren, werden bij verschillende latex- en albumineconcentraties de titers bepaald. Het volgende voorbeeld toont enige kenmerkende uitkomsten (Tabel II).

Uit deze en overeenkomstige waarnemingen kan men zien dat verhoging van de latexconcentratie eerst een bestaand effect duidelijker kan doen uitkomen. Bij verdere verhoging kan, zoals eerder is gezegd, het prozoneverschijnsel weer verloren gaan. Door wij-

Tabel II

Agglutinatiepatronen bij verschillende latex- en albumine concentraties

Serum	% latex suspensie	% alb. in buffer	Agglutinatiepatroon vóór inactivering									
			Reciproke verdunningen									
			20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
V	0,6	0,4	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
'	0,8	0,4	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
'	1,0	0,4	2	2	(+)	-	-	-	-	-	-	-
L	0,6	0,4	-	±	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-
'	0,8	0,4	±	2	2	2	2	2	(+)	-	-	-
'	1,0	0,4	(+)	2	2	2	1	(+)	-	-	-	-
K	1,0	0,0	1	±	1	2	1	(+)	-	-	-	-
'	1,0	0,2	1	1	(+)	(+)	±	±	-	-	-	-
'	1,0	0,4	(+)	±	±	±	-	-	-	-	-	-

ziging van de proefomstandigheden kan men van een negatief serum, dat na inactivering positief zou zijn geworden, een serum met prozone of een gewoon positief serum maken, afhankelijk van de latex- en albumineconcentratie. Het verschil tussen deze 3 categorieën hangt dan van de proefopstelling af en niet alleen van het serum. Dat de verkregen positieve reacties en prozones geen artefacten waren, bleek uit de negatieve controles en uit het verdwijnen van de prozones na voorafgaande verwarming van het proefserum op 56° C.

Het leek voor onze proefnemingen beter de vaak wat zwakke titers van actieve fracties op te halen door meer latex en minder albumine te gebruiken. Meestal werd 1 % latex en 0,2 % albumine gebruikt, waarbij nog net geen grote reeksen ± aflezingen in de laatste verdunningen werden gevonden. De titers die op deze manier worden verkregen, hebben geen klinische betekenis maar dienen in de eerste plaats als indicator bij het verdere onderzoek.

Het is duidelijk dat door wijziging van latex- en albumineconcentratie de hoogte van de titer en de grootte van het prozone-effect binnen een vrij groot interval min of meer naar keuze kunnen worden ingesteld. Dit kan van belang zijn wanneer men een andere soort latex wil gaan gebruiken of wanneer zou blijken dat een bepaalde latexsuspensie niet op een reproduceerbare wijze vervaardigd kan worden. Men zou dan b.v. met behulp van standaardsera bij iedere verandering van de latex de proef opnieuw kunnen ijken en ook de proeven in verschillende laboratoria op deze manier standaardiseren.

Behalve de eigenschappen van de latexdeeltjes speelt ook de kwaliteit van het gebruikte γ-globuline een rol. Bij proeven waarop in hoofdstuk IV nader wordt teruggekomen, bleek dat gezuiverd γ-globuline een geringere stabiliteit aan het latexdeeltje geeft dan het meestal gebruikte handelspreparaat, dat wisselende hoeveelheden β-globulinen en ook enig albumine bevat. Deze verontreinigingen, die per preparaat kunnen verschillen, zouden stabiliserend kunnen werken, zodat men ook hier met variaties rekening moet houden. Het effect van deze verontreinigingen bleek o.a. bij proeven waarin de remmende werking van verschillende hoeveelheden negatief serum op eenzelfde hoeveelheid positief serum werd onderzocht. Negatieve sera oefenen n.l. in de latexproef een remmende werking uit op de agglutinatie door positieve sera, die in hoofdstuk IV verder wordt besproken. Tabel III toont de schijnbare remmende werking van verschillende hoeveelheden negatief serum, die werden meeverdund met een bepaalde hoeveelheid positief serum, bij gebruik van een handelspreparaat en van gezuiverd γ-globuline. Men ziet dat de remmende werking bij overigens gelijke proefomstandigheden voor de beide preparaten verschilt. Dit kan veroorzaakt worden door de extra stabiliteit die aan het latexdeeltje gegeven wordt door verontreinigingen, die zoals b.v. albumine, een lager iso-electrisch punt hebben en daardoor bij de gebruikte pH een relatief grotere lading aan het deeltje geven. De zuivering werd uitgevoerd door chromatografie over DEAE-cellulose volgens Levy en Sober (49). Bij elutie met een 0,0175 M phosphaatbuffer van pH = 7,0 wordt alleen het 7 S γ-globuline uit de zuil gewassen.

Tabel III

Remming van de latexagglutinatie door negatief serum bij gebruik van verschillende γ-globulinepreparaten

ml serum		a) agglutinatiepatroon met ongezuiverd γ-globuline									
pos.	neg.	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
0,1	0,2	1	2	2	2	2	2	1	(+)	-	-
0,1	0,3	1	1	2	2	2	1	(+)	±	-	-
0,1	0,4	(+)	(+)	1	1	2	1	±	-	-	-
0,1	0,5	-	±	(+)	1	2	(+)	±	-	-	-
0,1	0,6	-	±	(+)	1	1	(+)	±	-	-	-
0,1	0,7	±	-	±	(+)	1	(+)	1	-	-	-
		b) idem met gezuiverd γ-globuline									
0,1	0,2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	(+)
0,1	0,3	2	2	2	2	2	2	1	1	1	(+)
0,1	0,4	(+)	1	2	2	2	2	1	1	1	(+)
0,1	0,5	(+)	(+)	1	2	2	2	1	1	1	(+)
0,1	0,6	±	±	(+)	1	2	2	1	1	(+)	(+)
0,1	0,7	-	±	(+)	1	2	2	2	1	1	(+)

3. Het latexproefsysteem in reducerend milieu

Omdat β_{2M}-globulinen reduceerbaar zijn (Deutsch en Morton, 16), en daarbij hun eventuele biologische activiteit verliezen, kan de reductie gebruikt worden als argument om een bepaalde reactie toe te schrijven aan β_{2M}-globulinen (zie Grubb en Swahn, 31). Ook van de R.A. factor wordt dit vermeld (25). Wanneer, zoals gewoonlijk wordt gedaan, het reductiemiddel bij het te onderzoeken serum wordt gevoegd en meeverdund in de latexproef, worden echter niet alle sera geheel negatief. Het zijn meestal juist de sterk positieve sera die na een dergelijke reductie een lage titer blijven houden. Om alle onzekerheid in dergelijke gevallen weg te nemen,

werd de latexproef in reducerend milieu opgezet. Hiertoe werd 2-mercapto-aethanol of cysteïne tot een eindconcentratie van resp. 0,01 M of 0,05 M aan de gebruikte glycinebuffer toegevoegd. Het cysteïne bleek reeds in de runderalbumine bevattende buffer een gele kleur en een neerslag te geven, waardoor de proef onbruikbaar werd. Met mercapto-aethanol werkte het systeem goed. Geen valse agglutinaties werden waargenomen en de agglutinerende activiteit van alle in het systeem beproefde R.A. sera ging geheel verloren. Dit was slechts ten dele het geval wanneer de mercapto-aethanol van te voren aan het serum toegevoegd en meeverdund werd, ook indien vóór de bepaling het serum met reductiemiddel onder stikstof werd bewaard. Vermoedelijk is de hoeveelheid R.A. factor bij sommige sera zo groot dat de reductie dan onvoldoende is. In het systeem met mercapto-aethanol in de buffer werden al deze sera negatief.

Tien na inactivering positieve sera werden op deze manier na reductie ook negatief, zowel wanneer de mercapto-aethanol meeverdund was als wanneer deze aan de buffer was toegevoegd. Deze eigenschap hebben de agglutinaties die na inactivering optreden dus met de R.A. factor gemeen. Valkenburg (71) vond hetzelfde bij 25 van zulke sera met mercapto-aethanol in een concentratie van 0,1 M aan het serum toegevoegd en meeverdund.

Men zou zich kunnen afvragen of het reducerend milieu niet elke agglutinatie belémmert. Dat dit niet het geval is, bleek uit proeven waarin latexdeeltjes met ovalbumine bekleed werden in plaats van met menselijk γ-globuline. Als agglutinerend systeem werd een anti-ovalbumineserum aan het systeem toegevoegd op dezelfde wijze als bij de latexproef met R.A. sera. Men kan zo een agglutinerend systeem krijgen dat zich geheel analoog aan het γ-globuline-R.A. factor-systeem gedraagt, maar waar het antilichaam geheel of grotendeels uit 7 S γ-globulinen bestaat. Dit systeem bleef met ongeveer dezelfde titers agglutineren in 0,02 M mercapto-aethanol. Dat γ-globuline na reductie nog in staat is de R.A. factor te binden, werd aangetoond door Wiedermann e.a. (75) zodat we kunnen aannemen dat het reductiemiddel op de R.A. factoren inwerkt (zie ook hoofdstuk IV en V).

De agglutinatie die met normale sera optreedt bij incubatie bij 37° C of lager (zie tabel I sub D) gaat in aanwezigheid van mercapto-aethanol door, Hieruit kan men twee conclusies trekken, ten eerste dat agglutinatie in reducerend milieu ook met γ-globuline

als substraat mogelijk is, en ten tweede dat dit soort reacties wezenlijk verschilt van de reacties veroorzaakt door de R.A. factor of na inactivering optredend. In hoofdstuk V wordt op deze kwestie verder ingegaan. In ieder geval blijkt nu al dat ook serologisch de beide soorten reacties uit de tabel van hoofdstuk I duidelijk onderscheiden kunnen worden.

HOOFDSTUK III

ISOLERING EN ONDERZOEK VAN THERMOSTABIELE AGGLUTINERENDE FRACTIES BIJ NEGATIEVE SERA

1. Inleiding

De in hoofdstuk I en II geconstateerde overeenkomst tussen de reactie van de R.A. factor en de na inactivering van negatieve sera optredende agglutinaties voert tot de veronderstelling, dat ook deze laatste reacties worden veroorzaakt door een β_{2M}-globuline. Deze veronderstelling ligt ten grondslag aan de in dit hoofdstuk te bespreken proeven, die tot doel hadden uit niet verhitte negatieve sera β_{2M}-globulinen te isoleren en deze op hun agglutinerend vermogen in de latexproef te onderzoeken. Twee technieken lijken hiervoor het meest geschikt: preparatieve ultracentrifugering en gelfiltratie over Sephadex G-200. Voor een goede bewijsvoering zijn beide nodig, omdat bij de gelfiltratie in de macromoleculaire fractie ook lipoproteïnen terecht komen (Flodin en Killander, 22), die bij de ultracentrifugering juist in een geheel andere fractie worden teruggevonden. Achtereenvolgens zullen beide technieken en de ermee verkregen uitkomsten worden besproken.

Omdat beide genoemde methoden op hetzelfde beginsel, n.l. scheiding naar molecuulgrootte berusten, werd ook getracht agglutinerende fracties naar hun lading te karakteriseren door middel van preparatieve electrophorese in een zetmeelblok.

Tenslotte worden nog enkele pogingen vermeld om met behulp van chromatografie tot een concentratie van serologisch actieve β_{2M}-globulinen te komen.

2. Materiaal en methoden

Verschillende methoden, die voor dit onderzoek werden ontwikkeld of aangepast, worden besproken bij de betrokken experimenten. Enkele analytische methodieken van meer algemene aard, die door het hele onderzoek heen werden gebruikt, worden hier afzonderlijk genoemd.

2.1. *Analytische ultracentrifugering* werd uitgevoerd met de Spinco E analytische ultracentrifuge, in de 12 mm standaardcel, al of niet in combinatie met de 12 mm prismavenstercel. De proeven werden steeds uitgevoerd bij 59780 t/min en 20° C en in 0,9% NaCl, gebufferd met 0,01 M phosphaatbuffer van pH = 7,2 als oplosmiddel, tenzij anders is vermeld. Opgegeven waarden van s zijn niet geëxtrapoleerd naar oneindige verdunning, omdat meestal met de onderzochte monsters verdere proeven moesten worden gedaan en verwarring met andere serumfracties bij de gebruikte, lage concentraties niet mogelijk was. Om dezelfde redenen werd niet teruggerekend naar water als "oplosmiddel", waarin trouwens de meeste onderzochte fracties niet oplossen.

2.2. *Immunologische technieken.* Immuno-electrophoreses werden uitgevoerd volgens de micromethode van Scheidegger (61) met een spanningsval van 9V/cm, gedurende 1 uur. De kleuringen werden uitgevoerd met amidozwart.

Immuno-diffusieproeven werden eveneens uitgevoerd op objectglaasjes en wel in hetzelfde agargel als bij de immuno-electrophorese, dus bij pH = 8,6. Dit geeft even goede uitkomsten als bij pH = 7,2, zoals meestal wordt gebruikt bij de techniek van Ouchterlony. De gaatjes hadden een diameter van 1,5 mm en werden met een injectienaald geponst op een onderlinge afstand van 5 mm.

De gebruikte antisera waren alle afkomstig van het Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusiedienst van het Nederlandse Rode Kruis te Amsterdam, behalve het anti-α_{2M}-globulineserum dat van de Behringwerke te Marburg a/d Lahn betrokken werd. Het antiserum, gericht tegen totaal mensenserum was afkomstig van een paard, de andere antisera van konijnen.

2.3. *Preparatieve electrophorese.* De zetmeelblok-electrophorese werd uitgevoerd volgens Bloemendal (9) in een perspexbak van 36,5 x 3,8 x 2 cm met deksel. Ongeveer 450 g zetmeel werd eerst met gedestilleerd water, daarna met 0,04 M phosphaatbuffer van pH = 8,1 en tenslotte met 0,02 M phosphaatbuffer pH = 8,1 gewassen. Met de laatste buffer werd het zetmeel tot een dikke pap gemaakt en in de bak gegoten. Het blok werd met parafilm en met een perspexdeksel gesloten en vervolgens verticaal opgesteld. Tussen de uiteinden en de electrodevaten werd contact gemaakt door middel van meermalen gevouwen stroken filtreerpapier, gewikkeld in parafilm. Het hoogteverschil tussen de electrodevaten bedroeg 15 cm. Hierna werd het geheel enkele uren in evenwicht gebracht in de koude kamer. Vervolgens werd een segment van 1 cm dikte uitgesneden op 4 à 5 cm van de kathode en gevuld met een mengsel van 1,6 ml serum en ongeveer 8 g zetmeel. Na afsluiting werd gedurende 16 uur bij 4° C een spanning van 150 V over het blok gelegd (stroomsterkte 17 mA). Na afloop werd het deksel verwijderd en een strook filtreerpapier boven op het zetmeel gelegd en aangedrukt tot deze

geheel bevochtigd was. De strook werd gedroogd en met amidozwart gekleurd voor een voorlopige localisatie van fracties. Het blok werd vervolgens in segmenten van 1 cm dikte gesneden en elk segment uitgewassen met 8 ml 0,9 % NaCl. Elk extract werd bij 280 mμ doorgemeten. In de meeste proeven werden de eluaten van verscheidene opeenvolgende segmenten groepsgewijze bij elkaar gevoegd. De samenstelling van de aldus verkregen fracties werd met behulp van de agarelectrophorese volgens Wieme (76) gecontroleerd.

2.4. Materiaal. De negatieve, normale sera, al dan niet positief na inactivering, werden verkregen van keuringen van donores voor de Bloedbank van het Academisch Ziekenhuis te Leiden. R.A. sera werden verkregen van de Afdeling Rheumatologie, eveneens te Leiden.

Het enige criterium voor het gebruik in de hierna te beschrijven proeven was de titer na inactivering. Er werden geen pogingen gedaan om deze verder te correleren met klinische gegevens.

3. Isolering van macroglobulinefracties met behulp van preparatieve ultracentrifugering

3.1. Centrifugering van totaal serum. Een experiment om de juistheid van de genoemde veronderstelling te toetsen, werd als volgt uitgevoerd: 2 buisjes van 3 ml behorend bij de Spinco L-rotor 40 werden gevuld met onverdunde sera, één dat na inactivering positief zou zijn geworden, en één negatief. Er werd gedurende 12½ uur op 36000 t/min (120.000 g) gecentrifugeerd bij 4° C, waarna met een pipetje met omgebogen punt 2 ml bovenlaag werd afgenomen. De benedenlaag werd verwijderd, nadat door omroeren eventueel aan de bodem hechtend bezinksel weer was opgelost. De voor de bezinking van de macroglobulinefractie benodigde sedimentatietijd was geschat met behulp van de formule

$$t = \frac{R_2 - R_1}{\frac{R_1 + R_2}{2}\omega^2} \cdot \frac{1}{s}$$

waarin R_1 en R_2 de afstanden zijn van meniscus of bodem van de buis tot het rotatiecentrum, s = de sedimentatiecoëfficiënt, verkregen uit een analytische ultracentrifugering, en ω de hoeksnelheid. De sedimentatietijd t werd ruim een uur langer genomen dan de formule aangaf.

Boven- en benedenlagen werden in de latex-fixatieproef onderzocht vóór en na de inactivering, met het volgende resultaat (Tabel IV):

Tabel IV

Latexagglutinaties van serumfracties na ultracentrifugering van totaal serum

	Na inactivering positief serum		Na inactivering negatief serum	
Fractie	Voor inactivering	Na inactivering	Voor inactivering	Na inactivering
Bovenlaag	-	-	-	-
Onderlaag	±	9/320	-	-

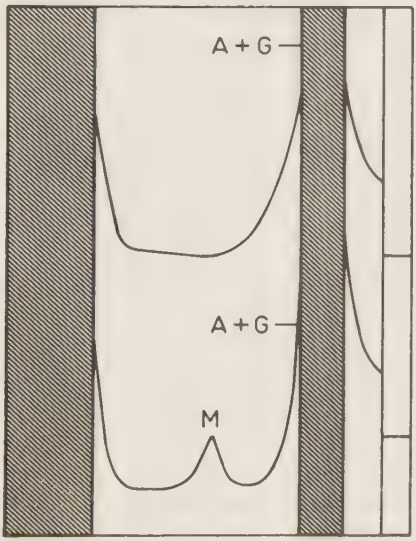


Fig. 2

Ultracentrifugediagrammen van fracties verkregen door preparatieve ultracentrifugering van totaal serum.
Sedimentatie van rechts naar links.
M = macroglobulinefractie
A+G = albumine- en lichte globulinefractie.
boven: bovenlaag
onder: bodemfractie

In de analytische ultracentrifuge bleken alleen de bodemfracties een waarneembare macroglobuline-top te hebben (zie fig. 2). Deze proef geeft een zekere steun aan de in de inleiding genoemde hypothese, omdat hieruit blijkt dat voor het inactiverings-effect een macroglobulinefractie nodig is.

3.2. Gradiëntcentrifugering. Verdere proeven werden gedaan met zonecentrifugering in een dichtsheidsgradiënt (Kunkel, 48). Bij deze methode wordt een hoeveelheid serum in een smalle zone boven op een dichtsheidsgradiënt van suikeroplossingen gebracht en bij een hoog toerental gecentrifugeerd. Elk eiwit bezinkt met zijn eigen sedimentatiesnelheid en vormt na enige tijd een homogene zone. De gradiënt verhindert menging van het serum met het milieu direct bij het begin van de proef en heeft verder een belemmerende werking op convectiestromingen. In tegenstelling tot de onder 3.1. besproken proef verkrijgt men op deze manier de fracties van verschillend moleculairgewicht gescheiden van elkaar. De lipoproteïnen komen bovendrijven door hun geringe dichtheid.

Bij de eerste proefnemingen werd per 6 ml buis, behorend bij de Spinco L-rotor SW39L, 0,3 ml van een 1/8 verdunning van een serum in 0,9 % NaCl gebracht op een gradiënt die was opgebouwd uit 6 gelijke laagjes van resp. 35, 30, 25, 20, 15 en 10 % saccharose in 0,9 % NaCl. De laagjes werden voor het opbrengen van het serum enkele uren te diffunderen gezet. Hierna werd de serumverdunning voorzichtig opgebracht en gedurende 18 uur gecentrifugeerd op 35000 t/min (134.000 g) bij 5° C. Door met een lens een geconcentreerde lichtbundel in de lengterichting van de buis te laten vallen en loodrecht hierop de verstrooiing waar te nemen, konden na afloop van de proef 3 à 4 tamelijk vage banden worden gezien. Deze werden geïsoleerd door de lusteroidbuisjes aan de zijkant vlak onder een band met een injectiespuit aan te prikken en de fractie eruit te zuigen. De fracties werden gedialyseerd tegen 0,9 % NaCl om de suiker te verwijderen en op een collodiumfilter geconcentreerd, alvorens in de analytische ultracentrifuge en in de latexproef te worden onderzocht.

Figuur 3 toont boven een ultracentrifugediagram van een aldus verkregen bodemfractie, die naar verhouding wel meer macroglobulinen bevat, maar nog in sterke mate verontreinigd is met 7 S globulinen.

Tabel V geeft de uitkomsten van het onderzoek van de verkregen fracties in de latexproef. De bodemfracties vertoonden agglutina-

Fig. 3

Ultracentrifugediagrammen van bodemfracties afkomstig van gradientcentrifugering van totaal serum.
Sedimentatie van recht naar links.
M = macroglobulinefractie
G = lichte globulinefractie
boven: eerste methode
onder: verbeterde methode

Tabel V

Latexagglutinaties van serumfracties na gradiëntcentrifugering (eerste methode)

Serum na inactivering	V +	V (herhaald) +	D -
bovenlaag	±	-	-
middenfractie	-	5/80	-
bodemfractie	8/320	7/320	1/20

ties zonder voorafgaande inactivering, in zeer geringe mate ook bij het na inactivering negatieve serum.

3.3. Verbeterde methode van gradiëntcentrifugering. De sterke verontreiniging van de bodemfractie met lichter materiaal in de vorige proeven is onbevredigend. Bovendien zijn met de beschreven methode de banden vaak slecht te zien. Het bleek echter mogelijk, op verschillende punten verbeteringen aan te brengen (Charlwood, 12). De gebruikte snelheid van centrifugeren leek te hoog in verband met de mogelijkheid van de vorming van een vast aanhechtend bezinksel onderin de buizen, terwijl het beter werd geacht kleine fracties onder uit de buis te tappen, volgens de methode van Szybalski (67). Verder bleek de suikergradiënt voldoende stabiliteit op te leveren om de proef in de vastehoekrotor uit te voeren met een gradiënt van 2 of 3 stappen van 30 naar 10 % suiker. Volgende proeven werden daarom als volgt opgezet:

In buisjes van de Spinco L-rotor 40 werden 3 laagjes suikeroplossing, resp. 30, 20 en 10 g saccharose in 100 ml 0,9 % NaCl, van elk 1,8 cm hoog, voorzichtig boven elkaar gebracht. Hierop werd dadelijk 0,5 ml van een 1/2 verdunning van een serum in 0,9 % NaCl gebracht en gedurende 16 uur op 25000 t/min (56.000 g) bij ongeveer 15° C gecentrifugeerd. Door een injectienaald werden langzaam (één druppel per sec.) fracties van onder uit afgetapt, de eerste 6 van 1 ml, daarna van 2 à 3 ml. Bij onderzoek in de analytische ultracentrifuge bleken de onderste 2,5 à 3 ml in het algemeen een vrijwel zuivere macroglobuline te bevatten (zie fig. 3 onder). In enkele gevallen werden de fracties van boven afgenomen met een pipetje met een 90° omgebogen punt. Dit leek iets meer menging van de gescheiden fracties op te leveren dan de eerste manier van afnemen. Alle fracties werden in de latexproef onderzocht op agglutinerende activiteit, zonder verhitting, maar na uitdialyseren van de suiker en concentreren tot ongeveer 1 ml in een collodium ultrafilter.

Tabel VI geeft de uitkomsten weer, die werden verkregen bij het onderzoek van 7 verschillende sera.

De conclusies uit deze proeven kunnen zijn, dat de agglutinaties na inactivering inderdaad worden veroorzaakt door een macroglobuline, terwijl in een andere, lichtere fractie zich een thermolabiele remmer moet bevinden. De agglutinerende eigenschap is dus niet door de verhitting ontstaan, omdat de agglutinerende fracties hier uit onverhitte sera werden geïsoleerd. Uit de uitkomsten blijkt nog niet of de factor een α_{2M}- of een β_{2M}-globuline is, omdat deze beide in dezelfde ultracentrifugefractie voorkomen. Verder is te zien dat ook bij de na inactivering negatieve sera

Tabel VI

Latexagglutinaties van serumfracties na verbeterde gradiëntcentrifugering

Serum na inactivering	V +	D -	Vr +	Ri +	Ve -	Ro +	S -
bovenlaag	-	-	-	-	-	-	±
middenfractie	-	-	4/160	-	-	(+)	±
bodemfractie	4/160	(+)	7/160	9/320	(+)	2/40	-

soms een zwakke reactie in de bodemfractie wordt aangetroffen. Dat deze bij het inactiveren van het totale serum in een verdunning van 1/20 niet wordt gevonden, is wellicht te wijten aan de geringe concentratie van de actieve factor. Ook bij de zetmeelblok-electrophorese van grotere hoeveelheden negatieve sera werd een enkele maal een positieve fractie in het β_2 - γ gebied gevonden (zie onder 6). Er is dus geen scherpe grens tussen na inactivering positieve en negatieve sera, maar waarschijnlijk een geleidelijke overgang. Om dit nader te bestuderen zou een bepaling van de opbrengst aan actief materiaal nodig zijn. Gezien de moeilijk te schatten verliezen die optreden bij de verschillende bewerkingen ten behoeve van de fractionering, lijkt het nog niet goed mogelijk een dergelijk quantitatief oordeel te vellen.

4. Euglobulinefractioneringen

Reeds bij de hiervoor beschreven preparatieve centrifugeringen werd het duidelijk dat we hiermee niet kunnen volstaan. De β_{2M}- en α_{2M}-globulinen komen immers beide in de bodemfractie terecht. Men zou kunnen stellen dat door het effect van de reductie (zie hoofdstuk II-3) al onderscheid tussen deze twee bestanddelen wordt gemaakt. Volgens Schulze e.a. (63) zijn immers de α_{2M}-globulinen, in tegenstelling tot de β_{2M}-groep, niet reduceerbaar, zodat deze kunnen worden uitgesloten. De proeven van Schulze en medewerkers konden echter door ons niet worden bevestigd, aangezien onder de-

zelfde omstandigheden wel degelijk een gedeeltelijke splitsing van het α_{2M}-globuline kon worden aangetoond. Het agarelectropherogram toonde vóór en na reductie geen verschil, maar in de ultracentrifuge nam de 19 S fractie af, terwijl daarnaast een langzamere fractie optrad. Na heroxydatie door dialyse gingen beide fracties verloren (44). Omdat dus ook het α_{2M}-globuline door reductie wordt aangetast, zegt het verlies van de agglutinerende activiteit na reductie nog niets over de aard van de hierbij betrokken macroglobulinen. Het blijkt dus noodzakelijk de twee groepen macroglobulinen van elkaar te scheiden. Een scheiding is mogelijk door preparatieve electrophorese in een zetmeelblok, zoals elders in dit onderzoek is toegepast. Dit is echter nogal bewerkelijk en daarom werd naar een snellere methode omgezien. Een mogelijkheid is de euglobulinefractionering, een precipitatie bij lage ionensterkte, die veel wordt toegepast om de R.A. factor te concentreren. Een veel gebruikte methode die bestaat in 10 à 15 x verdunnen van het serum met gedestilleerd water, bleek niet steeds een neerslag op te leveren. Vervolgens werd de precipitatie geprobeerd die door Ziff e.a. (78) is toegepast bij de bepaling van agglutinatietiters van R.A. sera. Een hoeveelheid serum wordt hierbij gedialyseerd tegen een grote overmaat 1/150 M citraatphosphaatbuffer van pH = 5,8. Tabel VII geeft enkele uitkomsten van dergelijke fractioneringen.

Tabel VII

Latexagglutinaties na euglobulinefractionering

Serum	Herkomst	Latexagglutinatie totaal serum	Latextiter neerslag	Latextiter bovenlaag
R	R.A.	latex positief	20/10240	9/320
P	R.A.	latex positief	20/10240	9/640
Z	normaal	na inact. positief	9/320	neg.
Be	normaal	na inact. positief	5/80	neg.
Bo	normaal	na inact. positief	8/320	neg.
J	normaal	na inact. positief	7/160	neg.

Analyse van bovenlagen en neerslagen door immunodiffusie met specifieke antisera toonde aan dat het β_{2M}-globuline voornamelijk in

het neerslag voorkomt, maar dat ook de bovenlaag nog sporen ervan bevat, zoals bij de R.A. sera ook aan de latextiters te zien is. Het α_{2M}-globuline bleek zich uitsluitend in de bovenlaag te bevinden. De activiteit in de latextest, ook bij na inactivering positieve sera, was hoofdzakelijk in het neerslag geconcentreerd, dat in de immuno-electrophorese overigens 7 S γ-globuline en enkele niet tot de immuunglobulinen behorende γ-globulinen bleek te bevatten. Dit betekent dat een bevredigende voorscheiding is verkregen en dat bovendien het α_{2M}-globuline, dat bij de andere gebruikte methoden niet van β_{2M}-globuline te scheiden is, is verwijderd. Bij de hierna te beschrijven scheiding werd daarom in vele gevallen van dit euglobulineneerslag uitgegaan.

5. Isolering van macroglobuline-fracties door gelfiltratie

5.1. Inleiding en voorproeven. Het principe van de gelfiltratie met Sephadex wordt beschreven door Flodin (23). Hierbij wordt gebruik gemaakt van gelkorrels van dwarsverbonden dextranen met bepaalde poriëngrootte, die alleen moleculen tot een bepaalde grootte doorlaten. In een zuil van een dergelijk gel hebben de grote moleculen een veel kleiner volumen beschikbaar dan de kleine, die zowel in als tussen de gelkorrels kunnen diffunderen. De grote moleculen komen bij elutie dus het eerste uit de zuil. Een sortering van de serumeiwitten naar molecuulgrootte lijkt zeer aantrekkelijk voor ons probleem, maar toen dit onderzoek begon, was het Sephadex G-75 (Pharmacia AB, Uppsala, Zweden) het gel met de grootste doorlaatbaarheid (alles met een M.G. $<$ 50.000). Later, nadat al een begin was gemaakt met de preparatieve ultracentrifugeringen, kwam het gel G-200 beschikbaar dat alles met een M.G. $>$ 200.000 buiten sluit. Het laatste type was voor ons aangewezen, omdat we immers in het euglobulineneerslag het β_{2M}-globuline (M.G. ong. 900.000) willen scheiden van andere globulinen (M.G. tot ong. 160.000). Met de eerste proefmonsters G-200 werd een begin gemaakt, voordat op litteratuurgegevens kon worden gesteund. Met een modelsysteem, bestaande uit een haemoglobinehoudend concentraat van koude-agglutininen (een β_{2M}-globuline), werd een scheiding tot stand gebracht tussen beide genoemde bestanddelen, waarbij het haemoglobine met het blote oog te volgen was, terwijl het koude-agglutinine gemakkelijk door zijn specifieke

biologische activiteit was terug te vinden*. De ongekleurde fracties vlak voor het haemoglobine bevatten het koude-agglutinine, waarmee de bruikbaarheid van het G-200 voor dergelijke scheidingen in beginsel was aangetoond. Bij deze proeven bleek dat grote zuilhoogte en een geringe hoeveelheid eiwit per zuil noodzakelijk waren.

5.2. *Modelproeven met pathologische sera.* Enkele proeven met gelfiltratie van R.A. sera werden uitgevoerd om de activiteit in de latexproef te localiseren. Een hoeveelheid Sephadex G-200 werd gesuspendeerd in 0,1 M phosphaatbuffer van pH = 7,4 waarin 0,2 M NaCl was opgelost. De toevoeging van het NaCl dient om adsorptie aan het gel tegen te gaan (zie 59). Na een nacht staan werd van de suspensie een zuil gegoten van 1 cm inwendige diameter en 35 cm hoog. Na het bezinken van de suspensie werd 0,3 ml van een sterk positief R.A. serum opgebracht. Na indringen van het serum in het gel en naspoelen met een kleine hoeveelheid buffer, werd geëlueerd met dezelfde buffer als waarin de G-200 gesuspendeerd was. Fracties van 1,5 ml werden opgevangen met behulp van een fractieverzamelaar met druppelteller. Alle bewerkingen werden bij 4° C uitgevoerd. De uitkomsten zijn in fig. 4 samengevat. De fracties 6 t/m 9 die de sterkste serologische activiteit vertoonden, werden samengevoegd en geconcentreerd in een ultrafilter. Een immuno-electrophorese van dit concentraat toonde geen γ-lijn, echter ook geen β_{2M}-lijn. De β_{2M}-lijn is echter in anti-totaal mensenserum slechts zwak vertegenwoordigd en de erbij horende activiteit is met de latexproef gevoeliger aan te tonen. Het bleek dat met behulp van de immuno-diffusietechniek in dergelijke gevallen wel een β_{2M}-globuline kan worden gevonden.

Overigens zijn de 3 toppen slecht van elkaar losgekomen (zie fig. 4), wat er op wijst, dat de hoeveelheid eiwit bij deze afmetingen van de zuil nog te groot is. De eerste eiwithoudende fracties waren bij deze en soortgelijke proeven meestal enigszins troebel door lipoproteïne. Aan deze troebeling kan men zien wanneer het eerste eiwit uit de zuil begint te komen. De activiteit in de latexproef bleek in de 1e top gelocaliseerd te zijn, zoals ook te verwachten was. Het 4e topje achter in het elutiediagram wordt veroorzaakt door laag-moleculair materiaal, dat het laatst uit de zuil komt.

* Wij danken Dr. R. van Furth voor zijn medewerking bij deze proeven.

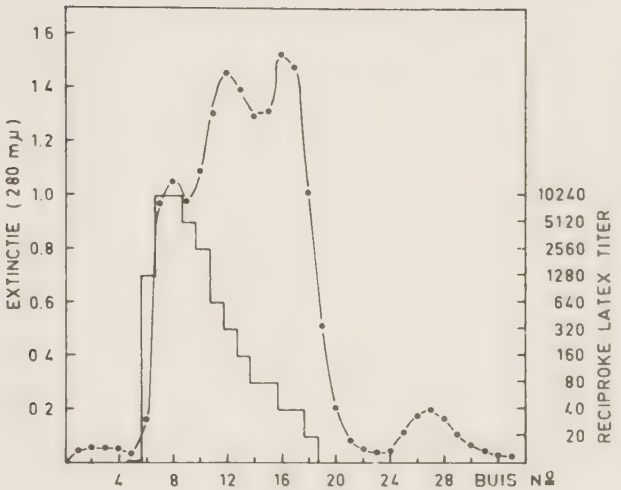


Fig. 4

Scheiding van een R.A. serum over Sephadex G-200.
Het blokdiagram geeft het verloop van de latextiter weer.

Een tweede modelproef werd gedaan met het serum van een lijder aan macroglobulinaemie van Waldenström, waarbij het gehalte aan β_{2M}-globuline zeer hoog is. De bedoeling hiervan was de plaats van het β_{2M}-globuline in het chromatogram beter te bepalen.

In een zuil van 1 cm diameter werd een suspensie van Sephadex G-200 in 0,1 M phosphaatbuffer van pH = 7,4 en 0,2 M NaCl gegoten tot een hoogte van 32 cm. Van het proefserum werd 0,1 ml opgebracht op dezelfde manier als in de vorige proef en geëlueerd met de phosphaatbuffer. Fracties van 1 ml werden verzameld en doorgemeten bij 280 mμ. Fig. 5 toont het verkregen chromatogram, waarin 2 niet geheel van elkaar losgekomen toppen te zien zijn. Immunologisch was er echter een vrij goede scheiding zoals bleek uit het immuno-electrophoretisch onderzoek van de fracties I, II en III. Fractie I had alleen een β_{2M}- en een α_{2M}-lijn, II en III een reeks van lijnen van albumine tot γ-globuline.

Het is dus wel duidelijk dat slechts weinig eiwit kan worden opgebracht. Om het te scheiden eiwitmengsel te verrijken met het actieve materiaal werd in de volgende proeven steeds de hiervoor besproken euglobuline-neerslagfractie van de te onderzoeken sera op de zuil gebracht. Enkele proeven werden ook uitgevoerd met 0,05 M tris-buffer van pH = 8,0 waarin 0,2 M NaCl was opgelost.

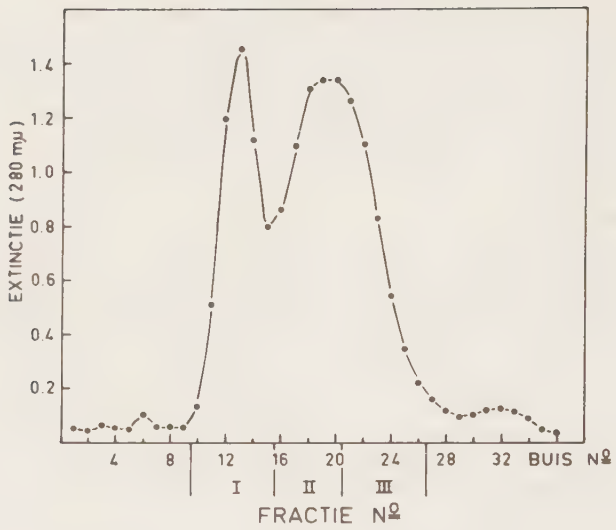


Fig. 5

Scheiding van een serum van een lijder aan macroglobulinaemie van Waldenström over Sephadex G-200.

Deze buffer werd in plaats van de phosphaatbuffer gebruikt om bij een wat hogere pH (verder van het iso-electrisch punt van de β_{2M}-globulinen) toch nog een goede buffering te krijgen. Het bleek echter, dat de euglobulineneerslagen moeilijker in deze buffer oplosten dan in de phosphaatbuffer. Om deze reden werd verder van het gebruik van tris-buffer afgezien.

5.3. Proeven met na inactivering positieve sera. Na verscheidene experimenten met euglobulineneerslagen van normale sera bleek de volgende proefopstelling een bevredigend resultaat op te leveren.

In een zuil van 12 mm diameter werd Sephadex G-200 gegoten tot een hoogte van 50 cm. De gebruikte buffer was weer 0,1 M phosphaatbuffer van pH = 7,5 met 0,2 M NaCl. Het euglobulineneerslag uit 1 ml na inactivering positief serum werd in deze buffer opgelost en op de zuil gebracht. Er werd zeer langzaam geëlueerd (ongeveer 1 ml/uur). Fracties van 1,2 ml werden opgevangen en bij 280 mμ doorgemeten.

Het chromatogram (zie fig. 6) toonde een duidelijke scheiding in 2 toppen. Om verliezen tijdens de concentrering te vermijden

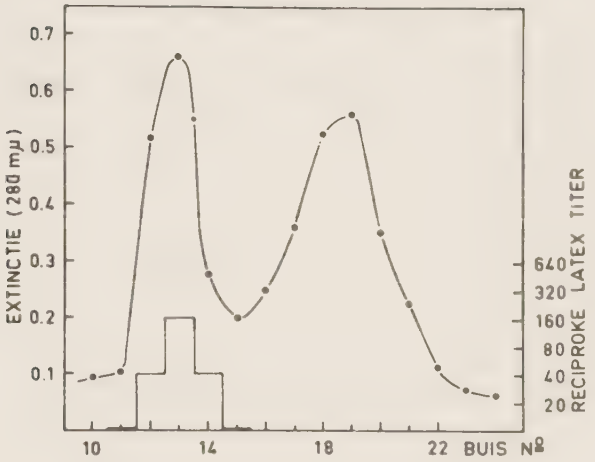


Fig. 6

Scheiding van een euglobuline-neerslagfractie van een normaal serum over Sephadex G-200.
Het blokdiagram geeft het verloop van de latextiter aan.

werd geprobeerd de activiteit terug te vinden door 1 ml van de G-200 fracties zonder enige verdere bewerking in de latexproef te onderzoeken. De activiteiten in de latexproef van elke fractie zijn in de grafiek aangegeven. De titer van het uitgangsserum (0,1 ml geïnactiveerd) was 1/20.

Fracties 11 t/m 15 en 16 t/m 22 werden bij elkaar gevoegd en elk van beide groepen tot 0,2 ml geconcentreerd. Hiermee werd een immuno - diffusieproef ingezet met anti-β_{2M}- en ook anti-totaalserum. De 1e top bevatte het β_{2M}-globuline en de activiteit in de latexproef, de 2e niet: echter was er ook een reactie van de 1e top met anti-totaalserum (2 boogjes), die niet nader geïdentificeerd werd. Er zijn dus verontreinigingen waarvan althans een deel lipoproteïne moet zijn (zie fig. 7).

Deze proef toont dus aan, dat alleen de β_{2M}-globuline bevattende serumfracties actief zijn in de latexproef.

In de volgende proef werd de latexagglutinatie niet buis voor buis gemeten, maar werden de bij de 2 toppen van het elutiediagram (zie fig. 8) behorende fracties in 3 groepen bij elkaar gevoegd en geconcentreerd tot ongeveer 0,5 ml. Het onderzoek van deze 3 fracties is in Tabel VIII samengevat.

Fig. 7

Analyse van concentraten van de 2 toppen van fig. 6 door middel van immunodiffusie.
A: met anti-β_2M-globulineserum
B: met anti-totaalmensenserum

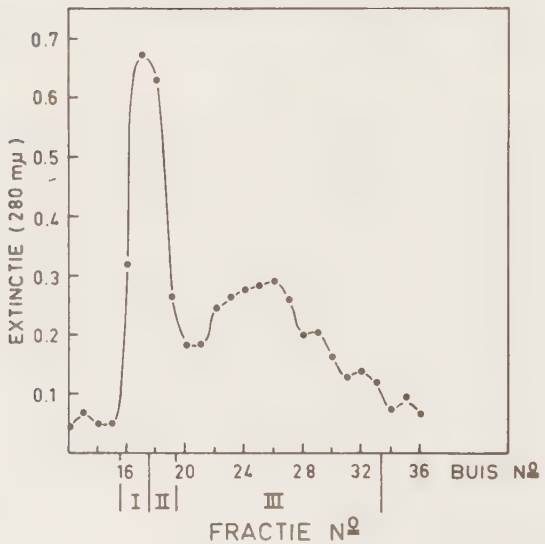


Fig. 8

Scheiding van een euglobuline-neerslagfractie van een normaal serum over Sephadex G-200.

Tabel VIII

Latexagglutinaties van gel-filtratiefracties

Fractie	Latextiter	Immunodiffusie reactie met anti-β_{2M}	Immunodiffusie reactie met anti-γ
I	4/160	duidelijke lijn	zwakke lijn
II	(+)	zwakke lijn	zwakke lijn
III	-	geen lijn	zeer sterke lijn

0,1 ml uitgangsserum: titer na inactivering 6/80

De opbrengsten lijken hier slechter dan in de vorige proef. De verliezen die geleden worden bij de verschillende bewerkingen zijn echter nogal onzeker, hoewel vooral bij de concentratie door ultrafiltrering het β_{2M}-globulinegehalte van de fracties achteruit gaat (James e.a., 41). Om deze redenen moet aan berekeningen van opbrengsten niet te veel waarde worden gehecht.

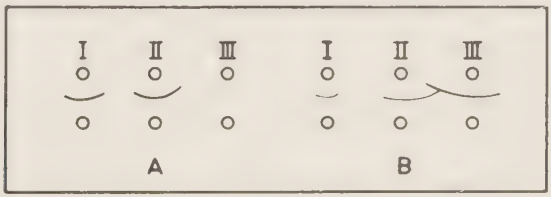


Fig. 9

Analyse van de fracties van fig. 8 door middel van immunodiffusie.
A: met anti-β_{2M}-globulineserum B: met anti-γ-globulineserum

De immuno-diffusieproeven (fig. 9) toonden weer duidelijk dat alleen de β_{2M}-globulinehoudende fracties in de latexproef actief waren. Echter was γ-globuline, hoewel in geringe mate, ook in de eerste fracties aan te tonen. Deze lijnen gaven slechts een partiële identiteitsreactie met die van fractie III, zodat het vermoeden rijst dat we hier met een kruisreactie te maken hebben. Dit vermoeden werd gesteund door andere immuno-diffusieproeven waarin het gebruikte anti-γ-globulineserum ook een zwakke reactie

met een gezuiverd β_{2M}-globuline preparaat te zien gaf. Geheel specifieke anti-γ-globulinesera gaven echter meestal ook een reactie met de 1e fractie, zodat kruisreacties niet een afdoende verklaring zijn. Een andere mogelijke verklaring is dat aggregaten van γ-globuline ontstaan, b.v. door denaturering bij de euglobulinefractionering. Zulke aggregaten kunnen, wanneer ze groot genoeg zijn, bij gelfiltratie in de macroglobulinefractie terecht komen. Dat complexen van een dergelijke grootte voorkomen, bleek uit ultracentrifuge-onderzoek van euglobulineneerslagen, waar tussen het 7 S- en het 19 S-gebied inderdaad een heterogene fractie gevonden werd. (fig. 10). Het γ-globulinekarakter van deze fractie werd echter niet nader vastgesteld.

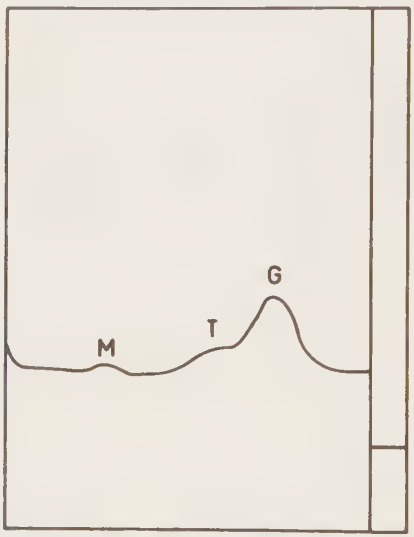


Fig. 10

Ultracentrifugediagram van een euglobuline-neerslagfractie.
Sedimentatie van rechts naar links.
M = macroglobulinefractie
T = tussenliggende fractie
G = lichte globulinefractie

De hier beschreven scheidingen werden met overeenkomstige resultaten uitgevoerd met 4 na inactivering positieve sera. Proeven met 2 negatieve sera leverden fracties op met dezelfde samenstelling, maar negatief in de latexproef.

Deze proeven maken het zeer waarschijnlijk dat de na inactivering van negatieve sera optredende agglutinaties veroorzaakt worden door een β_{2M}-globuline. De lipoproteïnen kunnen met deze methode niet van de β_{2M}-globulinen gescheiden worden, maar de in 3. beschreven ultracentrifugeproeven tonen aan, dat zij het agglutinerende effect niet veroorzaken.

6. Isolering van agglutinerende fracties met behulp van preparatieve electrophorese

De voorafgaande proeven hebben voornamelijk een karakterisering van de agglutinerende fracties door hun molecuulgrootte opgeleverd. Hoewel met specifieke antisera het β_{2M}-karakter van deze fracties waarschijnlijk werd gemaakt, lijkt het gewenst om ter bevestiging te onderzoeken of de actieve fracties ook electrophoretisch op dezelfde plaats terecht komen als het β_{2M}-globuline. Hiertoe werden normale na inactivering positieve of negatieve sera gescheiden in fracties met verschillende electrophoretische beweeglijkheid door middel van de onder 2.3. beschreven zetmeelblok-electrophorese. Het resultaat van een dergelijke scheiding is weergegeven in fig. 11, waar de extincties bij 280 mμ van de eluaten van alle segmenten van het blok zijn uitgezet tegen de plaats van elk segment, uitgedrukt in cm afstand van de kathode. De eluaten werden in groepjes bij elkaar gevoegd zoals in de figuur is aangegeven en door ultrafiltratie geconcentreerd tot ongeveer 1 ml. De uitkomsten van het onderzoek van deze fracties in agarelectrophorese en latexproef zijn voor een na inactivering positief serum en voor een negatief serum samengevat in Tabel IX.

De analyse door middel van agarelectrophorese gaf het verwachte resultaat. Bij het na inactivering negatieve serum werd ook een zwak positieve fractie gevonden. Aangezien echter van 1,6 ml serum werd uitgegaan, is een vrij hoge concentrering bereikt, zodat ondanks verliezen toch positieve reacties kunnen worden aangetoond, die bij de latexproef met 0,1 ml serum niet tevoorschijn komen. Evenals bij de ultracentrifugeproeven blijkt dus ook hier dat er geen scherpe scheiding is tussen positieve en negatieve sera. Opvallend is het voorkomen van de latexreactie in de langzame γ-globuline fractie waarin men geen β_{2M}-globuline zou verwachten. Bij analyse door middel van immunodiffusie met specifiek

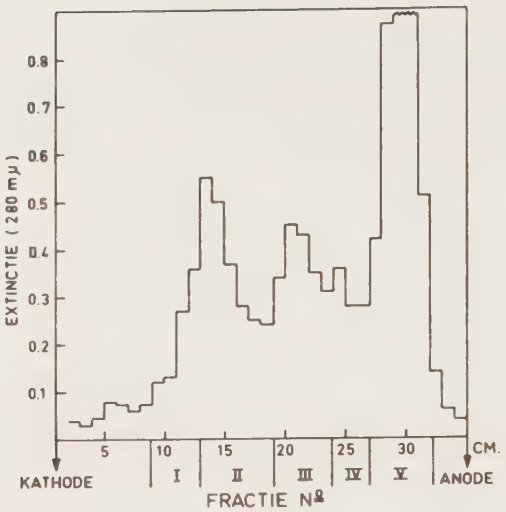


Fig. 11

Scheiding van normaal serum door electrophorese in een zetmeelblok.

Tabel IX

Latexagglutinaties van electrophoresefracties

Fractie	Agarelectrophorese	Latextiter	
		Pos. serum*	Neg. serum
I	langzame γ	7/160	3/40
II	snelle γ	2/40	(+)
III	β	±	±
IV	α + albumine	neg.	neg.
V	albumine	neg.	neg.

* 0,1 ml uitgangsserum: titer 7/160.

anti-μ_{2M} serum bleek het μ_{2M}-globuline echter in de fracties I en II voor te komen en niet in de andere fracties. Waarschijnlijk is er een chromatografisch adsorptie-effect aan het zetmeel, waardoor het β_{2M}-globuline niet op zijn electrophoretische β_2-plaats te vinden is. Deze proeven werden herhaald met 3 na inactivering positieve sera en 2 negatieve sera, met geheel gelijksoortige uitkomsten. Het blijkt dat ook met de electrophoretische scheidingstechniek de na inactivering optredende agglutinerende factor alleen in die fracties gevonden wordt waarin ook het μ_{2M}-globuline wordt aangetroffen.

7. Chromatografische scheidingen

In 1959 beschreven Lospalluto en Ziff (50) een chromatografische scheiding van R.A. sera over carboxymethyl-cellulose (CMC) in 4 fracties, waarvan de 3e reageerde met menselijk en dierlijk γ-globuline (precipitatie met F II en Waaler-Roseproef) terwijl de 4e alleen met menselijk γ-globuline reageerde. Bij 2 van 4 normale sera kwam alleen in de 4e fractie enig reactievermogen met menselijk γ-globuline voor, de andere twee waren geheel negatief. De Waaler-Roseproef was bij deze 4 sera negatief in alle fracties. Deze uitkomsten suggereerden een soortgelijk verschijnsel als bij de door ons bestudeerde positieve reacties na inactivering. Om deze reden werd de scheidingsmethode van Lospalluto en Ziff in studie genomen, waarbij eerst getracht werd de uitkomsten met R.A. sera te reproduceren. Zuilen van 1 cm inwendige diameter werden tot een hoogte van ongeveer 25 cm gevuld met CMC (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, cap. 0,66 maeq/g, droog gewicht ong. 5 g). Het CMC was van te voren geregenereerd met 0,01 N NaOH, neutraal gewassen met gedestilleerd water en daarna behandeld met 0,1 M phosphaatbuffer van pH = 7,0, dat is 10x de sterkte waarmee daarna de CMC in evenwicht werd gebracht. Wordt dit niet eerst gedaan, dan treedt tijdens de chromatografie een ongewenste pH-stijging op door elutie van nog niet volledig van de wisselaar verwijderd NaOH. Zoals in het voorschrift van Lospalluto en Ziff wordt aangegeven, werd de wisselaar daarna in evenwicht gebracht met 0,01 M phosphaatbuffer van pH = 7,0, dus een andere pH dan die van de eerste elutiestap. Eerst werd 1,5 ml van een in de latex- en Waaler-Roseproef sterk positief R.A. serum tesamen met een kleine hoeveelheid CMC in de dialysezak tegen dezelfde buffer

gedialyseerd. Het CMC in de dialysezak is nodig omdat anders bij elutie de laatste twee fracties vrijwel niet meer uit de zuil komen, vermoedelijk door euglobulineprecipitatie en daarop volgende denaturering. Wanneer vanaf het begin enig CMC aanwezig is, worden de euglobulinen dadelijk daarop geadsorbeerd (Fahey, 20). Hierna werd het serum met de CMC op de zuil gebracht en geëlueerd in de volgende 4 stappen:

I	100 cc	phosphaatbuffer	0,01 M	pH = 5,0
II	140 cc	"	0,05 M	pH = 6,0
III	80 cc	"	0,075 M	pH = 6,5
IV	80 cc	"	0,15 M	pH = 7,0

Elke stap werd in fracties van 5 ml opgevangen die bij 280 mμ werden doorgemeten. De 4 stappen werden geconcentreerd door ultrafiltratie en in de latex- en Waaler-Roseproef onderzocht. De uitkomsten zijn in tabel X weergegeven.

Tabel X

Fractionering van een R.A. serum volgens Lospalluto en Ziff

Serum	Latextiter	Waaler-Rosetiter	Immuno-electroph.	pH verloop eluaat
Fr. I	21/10240	1/256	alle lijnen	6,9 - 6,4
Fr. II	18/10240	1/128	γ - β	5,7 - 6,0
Fr. III	20/10240	1/128	γ - β - α_2	6,0 - 6,4
Fr. IV	11/10240	1/256	γ - β	6,5 - 6,9

Het pH-verloop in het eluaat wijst op een langzame evenwichtsinstelling. Niettemin trad een duidelijke fractionering op in die zin, dat met de aangegeven hoeveelheden buffer in elke stap op het laatst geen eiwit meer werd geëlueerd. Geen enkele scheiding van Waaler-Rose- en latexagglutinatie en geen concentrering van de activiteit werd verkregen. Het in evenwicht brengen van de wisselaar met de buffer van de 1e stap bracht hierin geen verbetering. Ook op deze manier werd in alle eiwithoudende fracties agglutinerend vermogen gevonden, zowel in de Waaler-Roseproef als in de latexproef. De uitkomsten van Lospalluto en Ziff, waarbij de Waaler-Rose-activiteit beperkt lijkt tot de 3e fractie, konden dus niet worden gereproduceerd.

Deze proef werd nog een keer herhaald met een ander R.A. serum. De CMC was nu geregenereerd met 0,5 N HCl, overigens waren alle proefomstandigheden als hiervoor beschreven. Bij de elutie werd in de 2e stap bijna geen eiwit geelueerd. De latextiters waren:

I	9/640	
II	5/320	
III	13/1280	Waaler-Rosetest niet gedaan.
IV	6/640	

Ook hier werd dus weer geen concentratie van de agglutinerende activiteit verkregen.

De spreiding van de R.A. factor-activiteit over zoveel verschillende fracties zou de uitdrukking kunnen zijn van een grote heterogeniteit van deze factoren. Men zou echter, gezien het pH verloop, ook kunnen denken aan een onvoldoende evenwichtsinstelling. Daartegen pleit echter dat het niet mogelijk was meer eiwit te elueren in elke elutiestap dan werd gedaan.

We kunnen dus wel zeggen dat het niet gelukt is om de resultaten van Lospalluto en Ziff te reproduceren. Overigens geven Bonomo e.a. (10) in een later artikel ook weer andere uitkomsten met dezelfde methode, waarbij nu de factoren die menselijk γ-globuline agglutineren over de laatste 3 stappen verspreid worden gevonden, terwijl de agglutinatie in de Waaler-Roseproef nog steeds alleen bij fractie III optreedt. Bij deze proeven wordt de wisselaar wel in evenwicht gebracht met de buffer van de eerste elutiestap. Gezien de verscheidenheid in de uitkomsten werd besloten om niet met deze methode verder te gaan.

De reden waarom deze negatieve uitkomsten toch nog kort worden besproken, is dat deze scheiding in de litteratuur herhaaldelijk wordt genoemd. Het leek daarom van belang enkele proeven, die andere resultaten hebben opgeleverd, kort mede te delen.

8. Discussie

Wanneer, zoals in dit hoofdstuk waarschijnlijk is gemaakt, meer dan de helft van de negatieve niet-R.A. sera toch nog geringe hoeveelheden van een R.A. factor blijkt te bevatten, komen de in

hoofdstuk I.2. gestelde alternatieven weer naar voren. Men kan zich nu dus voorstellen, dat auto-immuunprocessen in geringe mate zeer algemeen voorkomen, òf dat exogene oorzaken voor het veelvuldig optreden van de gevonden R.A. factor verantwoordelijk zouden zijn. Door Nienhuis e.a. (57) zijn deze alternatieven voor een analoog geval (het optreden van antinucleaire factoren buiten de auto-immuunziekten) op gelijke wijze gesteld. De uitkomsten van onze proeven laten geen beslissende keuze tussen deze twee mogelijkheden toe. Wel kan gezegd worden, dat onze bevindingen goed passen in de opvatting dat de R.A. factoren antilichamen tegen antigeen-antilichaamcomplexen zouden zijn. Deze opvatting heeft door het experimenteel opwekken van R.A. factoren bij proefdieren een zekere aannemelijkheid gekregen. Men kan zich voorstellen dat kleine hoeveelheden circulerende antigeen-antilichaamcomplexen, bijv. afkomstig van algemeen voorkomende acute infecties, bij herhaald optreden aanleiding geven tot een geleidelijk toenemende hoeveelheid R.A. factor(en). Hiervoor pleit het afwezig zijn van de reactie bij pasgeborenen (70) en de positieve reacties bij bejaarden (5). Door Valkenburg (71) werd een onderzoek ingesteld naar het voorkomen van na inactivering positieve reacties in sera van één- en twee-eiige tweelingen en in sera, afkomstig van een familieonderzoek, waaruit bleek dat de verantwoordelijke factor waarschijnlijk niet erfelijk is. Tenslotte zijn er nog enkele incidentele waarnemingen, waaruit blijkt dat na inactivering positieve sera hun titer niet altijd handhaven, maar dat deze aanmerkelijk kan schommelen. Al deze uitkomsten passen beter bij een theorie die een ontstaan van de factor als reactie op een uitwendige prikkel aanneemt. De na inactivering positieve sera zouden dan een bijzonder geval zijn van de z.g. vals positieve sera die bij sommige chronische infectieziekten optreden (zie hoofdstuk I.1.). In ieder geval kan gezegd worden dat het optreden van de R.A. factor bij rheumatoïde arthritis geen qualitatief maar een quantitatief onderscheid geeft met normale sera.

HOOFDSTUK IV

REMMERS VAN DE LATEX-FIXATIEPROEF

1. Inleiding

De in hoofdstuk III besproken agglutinerende factoren worden in de latexproef van Valkenburg en de Mos niet aangetoond, omdat er blijkbaar in het serum remmers van de agglutinatiereactie voorkomen die bij verhitting onwerkzaam worden gemaakt. Soortgelijke inhibitoren veroorzaken ook het prozone-effect, dat, zoals in hoofdstuk II is aangetoond, als een gedeeltelijke remming kan worden beschouwd.

Ook in vóór en na inactivering negatieve sera komen dergelijke remmers voor, zoals gemakkelijk kan worden aangetoond door verschillende hoeveelheden van een negatief serum met een constante hoeveelheid van een positief serum te mengen en in de latexproef te onderzoeken. Bij geschikt gekozen verhoudingen van negatief en positief serum vindt men een prozoneverschijnsel dat door voorafgaande verhitting van het mengsel of van het negatieve serum alleen, kan worden opgeheven.

In hoofdstuk I is gesteld, dat het in verband met een mogelijke biologische betekenis van de remmers belangrijk is om tot een nadere karakterisering te komen. Daarbij zou dan allereerst een standpunt ingenomen moeten worden ten aanzien van de twee verschillende meningen die in de litteratuur over dergelijke remmers te vinden zijn, n.l. dat zij behoren bij het complementsysteem (Brine e.a. 11, Schubart, 62), of dat er sprake is van aspecifieke stabilisatoren van de latexsuspensie, die alleen hun werking zouden uitoefenen door een extra lading aan de deeltjes mede te delen (Singer, 66).

Men kan aangaande deze remmers de volgende twee vragen stellen:

1e. Wat is het mechanisme van de remming? Wordt de remmer aan het latex-γ-globulinecomplex gebonden, of blokkeert hij de reactieve groepen van de agglutinerende factoren?
2e. Wat is de aard van de remmende factor(en)?

In dit hoofdstuk zal worden getracht op deze beide vragen een antwoord te geven.

2. Proefopstelling

Voor het beantwoorden van de twee genoemde vragen is een proefopzet nodig, waarbij het prozone-verschijnsel reproduceerbaar moet optreden. Spontaan optredende prozone-effecten geven hierbij vaak moeilijkheden, omdat het verschijnsel niet zo frequent met een voldoende duidelijkheid voorkomt en omdat de prozone bij lang laten staan bij kamertemperatuur, herhaald bevriezen en ontdooien en andere bewerkingen, verloren kan gaan. Dit laatste bezwaar geldt ook voor de na inactivering positieve sera. De remmende fractie is zo labiel, dat b.v. de in hoofdstuk III bij de gradiëntcentrifugering verkregen actieve bodemfractie niet altijd negatief kon worden gemaakt door weer toevoegen van de andere fracties, hoewel hierdoor toch de negatieve uitgangstoestand hersteld had moeten zijn. De concentrering van deze fracties was blijkbaar reeds voldoende om de remmer geheel of gedeeltelijk verloren te doen gaan.

Op grond van deze overwegingen werd besloten om eerst een indirecte proefopstelling te gebruiken, waarbij aan een hoeveelheid positief serum (gewoonlijk 0,1 ml met een titer van 12/640) een zodanige hoeveelheid negatief serum wordt toegevoegd dat een duidelijke prozone ontstaat, wanneer het negatieve serum met het positieve wordt meeverdund. Hiervoor is gewoonlijk 0,5 tot 0,6 ml negatief serum nodig. Het voordeel hiervan is dat de mate van remming door variatie van de hoeveelheid negatief serum zodanig kan worden gekozen dat het prozoneverschijnsel reproduceerbaar is. Op deze wijze kan dan de karakterisering van de remmer aan de hand van deze proefopstelling worden uitgewerkt. Later moeten de verkregen resultaten in een directe proef met een spontaan optredend prozoneserum of een na inactivering positief serum worden getoetst.

3. Mechanisme van de remming

3.1. Inleiding. De remmende factor(en) zouden in beginsel zowel op de agglutinator als op het latex-γ-globulinecomplex kunnen inwerken. In het eerste geval zouden zij de binding aan het γ-globuline onmogelijk kunnen maken, b.v. door het bezetten van een daarvoor benodigde plaats op het β_{2M}-molecuul. In het tweede geval kan men denken aan een stabilisatie van het latex-γ-globulinecomplex door een extra lading, verkregen door opname van het remmende bestanddeel, of aan het bezetten van een specifieke bindingsplaats voor het β_{2M}-globuline. Een stabilisatie van het latexdeeltje door gedeeltelijke bedekking met een ander eiwit zoals albumine dat door zijn lager iso-electrisch punt een grotere lading aan het deeltje geeft, is door Singer (66) gevonden. Naar aanleiding van deze proeven werd eerst geprobeerd een binding van de remmer aan het latex-γ-globulinecomplex aan te tonen.

3.2. Binding van de remmer aan het latex-γ-globulinecomplex. Hierbij is men genoodzaakt gebruik te maken van de onder 2 genoemde indirecte proef, omdat het latex-γ-globulinecomplex immers ook in staat is om de β_{2M}-agglutinator te binden. De remmer kan dus niet zonder meer selectief uit een prozoneserum of een na inactivering positief serum geadsorbeerd worden.

De indirecte proeven werden als volgt uitgevoerd:

Oplopende hoeveelheden latexsuspensie, gemaakt door 25x verdunnen van een stamsuspensie Dow latex (28,6 % vaste stof, waaruit ook de Difco Bacto Latex wordt gemaakt), werden gemengd met 8 ml 1 % γ-globuline, opgelost in de standaardbuffer, en daarna gedurende 40′ bij 20.000 g afgecentrifugeerd en 1x gewassen met dezelfde buffer. Vervolgens werden de verschillende hoeveelheden van het latex-γ-globulinecomplex gemengd met elk 1 ml negatief serum. Het mengsel werd na 1 nacht staan bij 4° C weer 40′ bij 20.000 g gecentrifugeerd. De bovenlagen die het serum bevatten waaruit de remmer geadsorbeerd zou kunnen zijn, werden gemengd met 0,1 ml van een zwak positief serum en het geheel werd in de gewone latexproef op de gebruikelijke manier onderzocht (vgl. middelste kolom van tabel XI A).

De latex-γ-globulineneerslagen die dus in meerdere of mindere mate met de remmer verzadigd zouden moeten zijn, werden onderzocht op hun vermogen om de R.A. factor uit 0,1 ml zwak positief serum te adsorberen (vlg. rechterkolom van tabel XI A). Hiertoe

Tabel XI

Adsorptie van remmer aan het latex-γ-globulinecomplex
A. Met runderalbumine als stabilisator

ml latex verd. voor ads. gebruikt	latex-γ-globuline + negatief serum																			
	bovenlaag										neerslag									
	+ 0,1 ml positief serum										+ 0,1 ml positief serum									
											bovenlaag									
	agglutinatiepatronen																			
1	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	2	2	2	2	(+)	-	-	-	-	-
2	-	-	±	(+)	(+)	±	-	-	-	-	2	2	±	-	-	-	-	-	-	-
3	±	±	(+)	1	1	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	±	(+)	2	2	1	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	(+)	2	2	2	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
controle titer positief serum											2	2	2	2	2	2	(+)	-	-	-
na ads. met 1 ml latex-γ-globuline											-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabel XI

Adsorptie van remmer aan het latex-γ-globulinecomplex
B. Zonder stabilisator

ml latex verd. voor ads. gebruikt	latex-γ-globuline + negatief serum																			
	bovenlaag										neerslag									
	+ 0,1 ml positief serum										+ 0,1 ml positief serum									
											bovenlaag									
	agglutinatiepatronen																			
1	-	-	-	±	±	(+)	1	1	(+)	-	1	1	±	±	±	-	-	-	-	-
2	-	-	±	(+)	1	2	2	1	(+)	±	±	±	-	-	-	-	±	-	-	-
3	±	±	(+)	1	2	2	2	1	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	(+)	(+)	1	2	2	2	2	(+)	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	(+)	1	1	2	2	2	2	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	1	1	2	2	2	2	1	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
controle titer positief serum											2	2	2	2	2	2	2	2	±	-
na ads. met 1 ml latex-γ-globuline											-	±	-	-	±	-	-	-	-	-

werden de neerslagen na verwijdering van het negatieve serum en 2x wassen met standaardbuffer, gemengd met 0,1 ml zwak positief serum en ongeveer 0,7 ml standaardbuffer; dit laatste om het volumen zoveel te vergroten dat het positieve serum na de adsorptie nog gemakkelijk van het latex-γ-globulineneerslag kon worden afgepipetteerd. Na 1 nacht staan bij 4° C werden de latex-γ-globulinecomplexen afgecentrifugeerd en de bovenlagen weer in hun geheel in de latexproef onderzocht. Tabel XI-A toont de uitkomst van een dergelijke proef, gedaan met een positief serum met een titer van 12/640, dat van te voren was geïnactiveerd om hierin eventueel aanwezige remmende bestanddelen uit te schakelen. In de controleproef bleek dat 1 ml van de 1:25 verdunde latexsuspensie, bekleed met γ-globuline, nog in staat was om alle R.A. factoren uit 0,1 ml van het positieve serum te adsorberen.

Uit deze en soortgelijke proeven valt het volgende te concluderen:

1e. De remmer wordt gebonden door het latex-γ-globulinecomplex. Adsorptie met toenemende hoeveelheden van dit complex heft namelijk het remmend vermogen van negatief serum in toenemende mate op (vgl. middelste kolom van tabel XI-A). Tevens blijkt, dat het complex steeds met de remmer verzadigd is, omdat ook 5 ml van de suspensie nog niet genoeg is om de remmende werking van negatief serum geheel op te heffen, m.a.w. in alle gevallen blijft na de adsorptie nog enige remmer achter in het negatieve serum.

2e. Van het met de remmer verzadigde latex-γ-globulinecomplex is meer nodig om dezelfde hoeveelheid R.A. factor te adsorberen, dan van het onbehandelde complex. Uit de rechterkolom van tabel XI-A blijkt namelijk, dat 2 ml van het latex-γ-globulinecomplex nog niet genoeg is voor het adsorberen van een hoeveelheid R.A. factor, die wel in zijn geheel aan 1 ml onbehandeld latex-γ-globuline kan worden gebonden (zie de controleproef).

Deze uitkomsten werden nog twee keer gereproduceerd. Bij verdere pogingen bleek onverwacht de remming steeds te overheersen. Dit werd veroorzaakt door onzuiverheden in het gebruikte γ-globulinepreparaat (zie hoofdstuk II-2.). Om de hierdoor veroorzaakte extra stabilisering te compenseren, werd de runderalbumine uit de proef weggelaten en een iets sterker positief serum gebruikt. Tabel XI-B laat zien dat hierdoor de eerder verkregen uitkomsten weer gereproduceerd konden worden. Dit is een bevestiging, zowel

van de hier gegeven opvatting over de remmer, als van de in dit proefschrift ontwikkelde denkbeelden over de invloed van de proefomstandigheden op het agglutinatiepatroon.

Men zou zich kunnen afvragen of soms de onzuiverheden in de gebruikte γ-globulinepreparaten voor het binden van de remmer verantwoordelijk zijn. Dat dit niet het geval is, bleek bij gebruik van immunologisch zuivere γ-globulinepreparaten, die volkomen dezelfde uitkomsten gaven.

Wil de remmer ondanks zijn thermolabiliteit toch zijn remmende werking in de latexproef blijven uitoefenen, dus bij een verhitting op 56° C, dan is dat alleen denkbaar als men het volgende aanneemt:

1e. De remmer wordt zeer snel geadsorbeerd op het latex-γ-globulinecomplex en
2e. In deze toestand is de remmer hittebestendig geworden.

Deze veronderstellingen werden getoetst door de hiervoor beschreven adsorptie van de remmer slechts gedurende 15 minuten te laten plaatsvinden. Dit bleek geen verschil te maken met een adsorptietijd van 18 uur zoals eerst werd gebruikt. Ook na 5 minuten adsorptie was er nog nauwelijks verschil met 18 uur. De thermostabiliteit na adsorptie werd aangetoond door de neerslagen die de remmer hadden opgenomen, gedurende ½ uur op 56° C te verhitten, gesuspendeerd in standaardbuffer. Na deze behandeling bleek nog steeds een grotere hoeveelheid van deze neerslagen nodig te zijn dan van onbehandeld latex-γ-globuline om de R.A. factor op te nemen uit een positief serum (vgl. tabel XI). De remmer blijft dus na verhitting zijn belemmerende werking op de reactie van de R.A. factor met zijn substraat uitoefenen wanneer hij op het latex-γ-globulinecomplex geadsorbeerd is, maar niet in oplossing.

3.3. Binding van de remmer aan het latex-γ-globuline-R.A. factorcomplex. De volgende vraag die zich voordoet, is of remmer en agglutinator dezelfde bindingsplaats op het γ-globulinemolecuul hebben. Bestudering van de binding van de remmer aan een latex-γ-globulinecomplex waaraan al R.A. factor gebonden is, zou gegevens kunnen opleveren over een mogelijke competitie tussen R.A. factor en remmer. Daarom werden ook adsorptieproeven met een latex-γ-globuline-R.A. factorcomplex opgezet.

Van een latexverdunning uit de stamsuspensie (zie 3.2.) werd 3 ml gemengd met 8 ml 1 % γ-globuline in standaardbuffer. Het latex-γ-globulinecomplex werd afgedraaid en 1x gewassen. Vervolgens werd aan het complex 0,5 ml van een sterk positief R.A. serum toegevoegd (latextiter > 20/10240). Na 1 ½ uur verhitting op 56° C en een nacht staan, werd het neerslag in een tafelcentrifuge afgedraaid en met standaardbuffer gewassen totdat het waswater negatief reageerde in de latexproef. Dit bleek pas na 10x wassen het geval te zijn.

Pogingen om met een dergelijk complex de remmende bestanddelen uit negatieve sera te adsorberen, mislukten, omdat de negatieve sera na menging en incubatie met het latex-γ-globuline-R.A. factorcomplex positief gingen reageren in de gewone latexproef, nadat het complex door centrifugeren verwijderd was. Ondanks het grondige wassen van dit complex bleek het dus toch nog R.A. factor aan het negatieve serum af te geven. Een zelfde effect was te verkrijgen door het latex-γ-globuline-R.A. factorcomplex in aanraking te brengen met een oplossing van menselijk serum-albumine in plaats van met totaal serum. Of dit berust op een loslaten van de R.A. factor van het deeltje, of op een losser maken van het zeer compacte neerslag door een detergenswerking van het albumine, waardoor resten van niet uitgewassen R.A. serum vrij kunnen komen, werd niet duidelijk. Wel blijkt hieruit, dat een verdringing van de R.A. factor door de remmer niet als verklaring voor de positieve reacties kan worden aangenomen. Dat deze complexen niet in een evenwichtstoestand verkeren, bleek ook nog uit het feit dat ondanks overmaat van R.A. serum bij het vormen van het complex, na wassing soms nog R.A. factor uit een zwak positief serum kon worden geadsorbeerd.

Om deze redenen moest van verdere proeven met dergelijke complexen worden afgezien, zodat nog geen beslissing kon worden genomen omtrent de vraag of er competitie optreedt tussen remmer en agglutinator om dezelfde plaats op het γ-globulinemolecuul.

4. De aard van de remmer

4.1. Inleiding. Nu is aangetoond, dat de remmer aan latex-γ-globuline wordt gebonden, is hiermede een basis gegeven aan de in de litteratuur uitgesproken mening dat de remming in de latexproef veroorzaakt zou worden door complement (zie inleiding 1).

Door Ishizaka e.a. (38,39) werd n.l. gevonden dat door verhitting gedenatureerd γ-globuline complement kan binden en dat de verschillende bestanddelen hiervan in dezelfde volgorde worden gebonden als bij antigeen-antilichaam-complexen, dus in de volgorde $C_1' - C_4' - C_2' - C_3'$. Het C_0' is hierbij voorlopig buiten beschouwing gelaten; in hoofdstuk V zal hierop nog worden teruggekomen. Indien men het op de oppervlakte van een latexdeeltje gespreide γ-globuline als gedenatureerd beschouwt, zou men verwachten dat ook het latex-γ-globulinecomplex complement kan binden. Wanneer dit het geval zou zijn, dan zouden zowel het door hitte gedenatureerde γ-globuline als het latex-γ-globulinecomplex zich ook in dit opzicht geheel analoog gedragen aan antigeen-antilichaamcomplexen, die zowel complement als R.A. factor kunnen binden.

Het onderzoek naar de aard van de remmer werd in de eerste plaats gericht op de vraag, of de remmer met één der thermolabiele bestanddelen van het complementsysteem identiek is en in hoeverre ook andere bestanddelen van dit systeem bij de remming betrokken zijn. Verschillende werkwijzen zijn in de serologie in gebruik om het gehele complementsysteem of afzonderlijke componenten daarvan te inactiveren. Voor zover deze technieken in dit onderzoek werden gebruikt, werden zij eerst gecontroleerd in een complement-bepalingsproef met een haemolytisch systeem, die als volgt werd uitgevoerd:

Schapenerythrocyten worden gesensibiliseerd met 3 maal de minimale haemolytische dosis van een amboceptor, waarna aan 0,5 ml van een 1,5 % erythrocytensuspensie 0,01 - 0,08 - 0,10 - 0,20 - 0,30 - 0,40 - 0,50 ml van het te onderzoeken serum wordt toegevoegd, en het geheel tot 1,5 ml wordt aangevuld met een buffer van de volgende samenstelling:

NaCl	85	g
Veronal	6,43	g
Na-veronal	3,07	g
$CaCl_2$	0,28	g
$MgCl_2.6H_2O$	1,68	g

Na ½ uur staan bij 37° C wordt de mate van haemolyse van elke verdunning op het oog beoordeeld.

In de volgende paragrafen zullen proeven worden beschreven, waarbij werd nagegaan of met de complement-inactiveringstechnieken behalve het complement ook de remmer van de latex-fixatieproef uitgeschakeld kan worden.

4.2. Binding van de remmer aan antigeen-antilichaamcomplexen.
Complement kan worden geadsorbeerd aan antigeen-antilichaamcomplexen. Het vermogen van dergelijke complexen om de remming van de latexproef op te heffen, werd in de directe en in de indirecte proef onderzocht.

Er werd gebruik gemaakt van een immuunprecipitaat van ovalbumine (Nutritional Biochemicals Corporation, 2x gekristalliseerd) met een daartegen in een konijn opgewekt antiserum. Het aequivalentiepunt bleek voor dit antiserum te liggen bij 800 γ ovalbumine per ml en het neerslag bevatte 1,0 mg antilichaam-N per ml antiserum. Neerslagen werden gemaakt bij deze verhouding of bij 600 γ ovalbumine per ml antiserum. De benodigde hoeveelheid albumine werd opgelost in 0,01 M phosphaatbuffer van pH = 7,2, waarin 0,9 % NaCl was opgelost. Na toevoegen van de berekende hoeveelheid konijneserum werd het mengsel 1 uur bij 37° C en 4 - 6 dagen bij 4° C bewaard. Het konijneserum was van te voren geïnactiveerd om te voorkomen dat konijnecomplement aan de neerslagen zou worden gebonden. Het neerslag werd gecentrifugeerd en 2x gewassen met de bovengenoemde phosphaatbuffer.

Met aldus uit 0,3 ml konijneserum verkregen neerslag werd getracht de remmer te adsorberen uit 0,5 ml negatief serum. Na 1 nacht staan bij 4° C werd het neerslag afgecentrifugeerd en de remmende werking van het bovenstaande serum op 0,1 ml zwak positief serum onderzocht (de indirecte proef). Tabel XII toont een kenmerkende uitkomst, die in het geheel in 7 verschillende proeven werd gereproduceerd met diverse positieve en negatieve sera.

Tabel XII

Adsorptie van de remmer door antigeen-antilichaamcomplexen

Serum	Agglutinatiepatroon									
Pos. serum	2	2	2	2	2	2	±	-	-	-
Pos. serum + neg. serum voor adsorptie	(+)	(+)	1	1	2	2	±	-	-	-
Pos. serum + neg. serum na adsorptie	2	2	2	2	2	2	(+)	-	-	-

De in 4.1. besproken haemolyseproef toonde aan dat bij deze adsorpties het complement inderdaad door het immuunprecipitaat verwijderd was.

In de indirecte proef gedraagt de remmer zich dus inderdaad als complement. Hierna werd getracht een zelfde effect in de directe proef waar te nemen, door sera die na inactivering positief waren in plaats van de inactivering te behandelen met immuunprecipitaten. Deze pogingen leverden echter geen duidelijke uitkomsten op. Om te onderzoeken of dit het gevolg was van een eventuele adsorptie van de agglutinerende factor door het neerslag, werd de invloed van een behandeling met de neerslagen op de titer van reeds te voren geïnactiveerde sera nagegaan. Inderdaad daalde de titer van 6 van de 8 onderzochte sera duidelijk na 1 nacht staan met het immuunprecipitaat, hoewel in verschillende mate. Dit verklaart de onduidelijke uitkomsten van de directe adsorptieproeven, omdat zowel remmer als agglutinerende factor, de laatste in niet duidelijk reproduceerbare mate, worden geadsorbeerd.

Wanneer deze adsorptie specifiek is, zou dit betekenen dat de agglutinerende factoren in normale sera geheel of gedeeltelijk met dierlijk γ-globuline (dat immers deel uitmaakt van het immuunprecipitaat) kunnen reageren, net als de klassieke R.A. factoren. Men zou echter ook met een aspecifieke adsorptie te doen kunnen hebben, die veroorzaakt zou kunnen worden door ionenwisselaar-eigenschappen van het immuunprecipitaat. Dit laatste werd gesuggereerd door adsorptieproeven met sera, die koude-agglutininen bevatten. Deze hebben als substraat de wand van de erythrocyt en reageren dus niet met γ-globuline. Niettemin werden de koude-agglutininen uit een serum in een in duplo uitgevoerde proef in aanzienlijke mate aan het immuunprecipitaat geadsorbeerd. De belangrijke vraag naar het substraat van de agglutinerende factoren in normale sera kan dus door deze proeven niet worden beantwoord. Deze kwestie zou echter zeker een nader onderzoek verdienen.

4.3. Binding van het complement aan het latex-γ-globulinecomplex. Behalve door antigeen-antilichaamcomplexen kan complement ook worden geadsorbeerd door een latex-γ-globulinecomplex, zoals bleek uit proeven met het haemolytische systeem. Hiervoor werden de concentraties gebruikt, waarvan in 3.2. is gebleken, dat ze bruikbaar waren om in de indirecte proef de remmer te adsorberen uit negatief serum, n.l. 1,0 ml latex-γ-globulinesuspensie, 1:25 verdund, op 1,0 ml negatief serum. Na mengen en 1 nacht staan bij 4° C werd de latex afgecentrifugeerd en het bovenstaande serum vergeleken met een zelfde hoeveelheid onbehandeld serum in de in 4.1. beschreven haemolyseproef. De gebruikte hoeveelheden waren

altijd voldoende om al het complement uit een zelfde volumen serum te verwijderen. Aangezien zowel complement als remmer worden geadsorbeerd, is hier dus een analogie tussen het complementsysteem en de remmer aangetoond.

Wiedermann e.a. (75) toonden aan dat geaggregeerd γ-globuline, behandeld met een reductiemiddel (2-mercaptoaethanol), niet meer in staat is om complement te binden, maar nog wel met de R.A. factor reageert. Dit gaf aanleiding om proeven te doen met een complex van latex met gereduceerd γ-globuline, dat als volgt werd gemaakt:

Aan een 1 % γ-globuline-oplossing in standaardbuffer werd 2-mercaptoaethanol toegevoegd tot een eindconcentratie van 0,1 M. Na 1 uur staan werd een verzadigde oplossing van joodacetamide toegevoegd tot een lichte overmaat t.o.v. het reductiemiddel. De optredende pH-daling werd opgeheven door toevoeging van verdunde loog. Tenslotte werd 18 uur gedialyseerd tegen standaardbuffer om overmaat joodacetamide te verwijderen. De verkregen γ-globuline-oplossing werd op de gewone wijze gebruikt om latexdeeltjes mee te bekleden.

Na centrifugeren bij 20.000 g en 1x wassen met standaardbuffer werd het complex van latex met gereduceerd γ-globuline gebruikt om de remmer uit negatief serum te adsorberen, in dezelfde verhoudingen als in de proeven met niet gereduceerd γ-globuline (zie 3.2.). 0,1 ml zwak positief serum (titer 10/640) werd gemengd met 0,8 ml negatief serum, dat te voren was behandeld met 6 ml 1:25 verdunde latex, bekleed met gewoon of gereduceerd γ-globuline. Tabel XIII toont de uitkomsten van de latex-fixatieproeven met 5 verschillende negatieve sera. Het blijkt dat latex met gereduceerd γ-globuline niet of in veel mindere mate in staat is om de remmer te adsorberen uit negatief serum. Uit proeven met het genoemde haemolytische systeem bleek bovendien dat latex met gereduceerd γ-globuline inderdaad geen complement meer kan binden. Ook hier gedragen remmer en complement zich dus weer overeenkomstig.

2 ml 1:25 verdunde latex, op de gebruikelijke wijze bedekt met van te voren gereduceerd γ-globuline, was nog in staat om alle agglutinerende activiteit te adsorberen uit 0,1 ml positief serum in 6 proeven met titers van 1/160 tot 1/1280. Ook in het latex-γ-globulinesysteem wordt de binding van de R.A. factor dus niet door reductie beïnvloed, waaruit volgt dat de bindingswijze voor R.A. factor en remmer verschillend moet zijn.

Bij dergelijke experimenten kan weer alleen de indirecte proef gebruikt worden om de invloed op de remming na te gaan. Het latex-

Tabel XIII

Adsorptie van remmer door latex-γ-globuline vóór en na reductie

Proef No.	Titer na adsorptie van de remmer met	
	onbehandeld γ-globuline	gereduceerd γ-globuline
1	6/160	3/80
2	8/320	±
3	6/160	±
4	9/320	±
5	12/640	3/320*

*prozone

γ-globulinecomplex adsorbeert immers de betrokken R.A. factoren, zodat de directe proef, waarbij latex-γ-globuline aan een prozoneserum of een na inactivering positief serum wordt toegevoegd, niet uitvoerbaar is. De hier besproken proeven maken het waarschijnlijk, dat de remmer deel uitmaakt van het complementsysteem. Nu zal nog moeten worden uitgemaakt, welke component(en) van dit systeem werkzaam zijn.

4.4. Binding van het complement aan het latex-γ-globuline-R.A. factorcomplex. Strikt genomen is de binding van complement aan latex-γ-globuline-R.A. factorcomplexen een probleem dat in dit hoofdstuk niet thuishoort, zolang niet volkomen zeker is dat complement en remmer identiek zijn. Aangezien dit echter nu wel waarschijnlijk gemaakt is, lijkt het de moeite waard aan de complementbinding door deze complexen enige aandacht te besteden, temeer omdat in 3.3. is aangetoond, dat de met R.A. factor verzadigde complexen niet gebruikt kunnen worden in proeven waarbij wordt getracht de remmer te adsorberen. De enige mogelijkheid om nog iets over het gedrag van deze complexen te weten te komen, is de bestudering van hun vermogen tot complementbinding, omdat de proefopstelling hiervoor niet wordt gestoord door eventueel vrijkomende R.A. factor.

De nu te bespreken proeven hadden tot doel na te gaan of een

met R.A. factor verzadigd latex-γ-globulinecomplex in dezelfde mate complement bindt als een onbehandeld complex. Hiertoe werd het complementgehalte van met elk van beide soorten complexen behandelde serummonsters vergeleken met dat van het onbehandelde serum.

De proeven werden als volgt uitgevoerd: 2 ml 1: 25 verdunde latex werd gemengd met 13 ml 1 % γ-globuline-oplossing in standaardbuffer. Na ½ uur werd het latex-γ-globuline afgecentrifugeerd en het sediment gemengd met 0,54 ml van een sterk latex-positief R.A. serum, dat van te voren 30' op 56° C was verhit om hierin aanwezig complement onwerkzaam te maken. Het mengsel werd 1 ½ uur op 37° C verwarmd. Na 1 nacht staan bij kamertemperatuur werd het verkregen latex-γ-globuline-R.A. factorcomplex afgecentrifugeerd en 10x gewassen. De eerste porties wasbuffer reageerden steeds positief in de latexproef, waaruit werd geconcludeerd, dat het complex inderdaad met R.A. factor verzadigd was. Aan het gewassen complex werd 2,5 ml van een normaal menselijk serum toegevoegd voor de adsorptie van complement. De adsorpties werden uitgevoerd gedurende 1 nacht bij 4° C in een schudapparaat. Het behandelde serum werd in het in 4.1. beschreven haemolytische systeem vergeleken met een serummonster dat op dezelfde wijze met latex-γ-globuline zonder R.A. factor was behandeld, en met een onbehandeld serum.

Tabel XIV

Adsorptie van complement uit normale menselijke sera door verschillende latexcomplexen

ml serum	0,6	0,4	0,2	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01
ml buffer	0,4	0,6	0,8	0,9	0,92	0,94	0,96	0,98	0,99
onbehandeld serum	0	0	0	0	0	0	1	3	4
na ads. met latex-γ-glob.	3	3	4	4	4	4	4	4	4
na ads. met latex-γ-R.A. f.	1	2	3	4	4	4	4	4	4

In tabel XIV zijn de uitkomsten van enkele van zulke proeven weergegeven. De getallen van 0 t/m 4 stellen schattingen van de troebeling voor van volkomen helder (cijfer 0), dus volledig gehaemolyseerd, tot volkomen troebel zonder enige haemolyse (cijfer 4).

Het blijkt dat voorafgaande binding van R.A. factor aan latex-γ-globuline een waarneembare, maar geringe daling van het vermogen om complement te binden ten gevolge heeft. Deze uitkomsten werden in 6 verschillende proeven gereproduceerd. De invloed van de volgende proefvariaties op de uitkomsten werd onderzocht:

a. Incubatie van latex-γ-globuline met R.A. serum bij 56° C i.p.v. bij 37° C.
b. Adsorptie van complement gedurende 45' i.p.v. 1 nacht.
c. Niet of slechts 4x wassen van het latex-γ-globuline-R.A. factorcomplex i.p.v. 10x.

Al deze variabelen hadden wel invloed op het niveau van de complementbinding, echter niet op het verschil in complementbinding tussen behandelde en onbehandelde latex. De conclusie blijft dus dat de R.A. factor het complement slechts in geringe mate belemmert bij zijn binding.

Deze conclusie geldt alleen, wanneer de R.A. factor zelf geen complement bindt. Hoewel dit in de litteratuur vermeld wordt (zie Brine e.a., 11), tonen alleen Davis en Bollet (14) duidelijk aan, dat, althans in hun proefsysteem, door de R.A. factor zelf geen complement wordt gebonden. Het zou gewenst zijn, dit ook voor het latexsysteem nog verder te bevestigen. Door ons werd de binding van complement door de R.A. factor niet systematisch onderzocht.

Hoewel de hier verkregen uitkomsten niet mogen worden betrokken op de remmer van de latex-fixatieproef, mag toch worden gezegd, dat gezien de overeenkomst tussen remmer en complement enerzijds, en de geringe invloed van binding van complement en remmer op de adsorptie van de R.A. factor anderzijds (zie 3.2.), een resultaat als hier verkregen kon worden verwacht.

4.5. Inactivering van de verschillende componenten van het complementsysteem. In de serologie zijn specifieke werkwijzen ontwikkeld om elk van de vier hoofdbestanddelen van het complementsysteem onwerkzaam te maken (zie Kabat en Mayer, 42). Bij het

toepassen hiervan op ons probleem zal de samengesteldheid van enkele van deze componenten buiten beschouwing worden gelaten, evenals het C'_0, dat in hoofdstuk V nog ter sprake zal komen. Uitgegaan wordt van de opvatting dat aan het latex-γ-globulinecomplex, evenals aan gedenatureerd γ-globuline (Ishizaka, 39) de bestanddelen van het complement zich binden als volgt: L - γ $\longrightarrow$ L - γ - C'_1 $\longrightarrow$ L - γ - C'_1 - C'_4 $\longrightarrow$ L - γ - C'_1 - C'_4 - C'_2 $\longrightarrow$ L - γ - C'_1 - C'_4 - C'_2 - C'_3. Alleen C'_1 en C'_2 zijn uitgesproken thermolabiel, evenals de remmer, maar het is niet uitgesloten dat ook thermostabiele bestanddelen bij het remeffect nodig zijn.

Eerst beschouwen we deze bestanddelen en hun inactivering.

1e. Inactivering van C'_3 werd uitgevoerd door in 1 ml serum 2 mg zymosan (The Fleischmann Laboratories) te suspenderen en de suspensie 1 uur bij 37° C te verwarmen. Daarna werd het zymosan afgecentrifugeerd en het bovenstaande serum in de indirecte proef op zijn remmend vermogen onderzocht.

2e. Inactivering van C'_4 werd uitgevoerd door aan 1 ml serum 0,25 ml 0,15 N ammonia toe te voegen en dit mengsel 1 uur op 37° C te verwarmen. Daarna werd geneutraliseerd met een gelijke hoeveelheid 0,15 N HCl, waarna het remmend vermogen van het aldus behandelde serum vergeleken werd met dat van een in dezelfde mate met 0,15 N NH_4Cl verdund onbehandeld serum in de directe en indirecte proef. De resultaten van deze inactiveringen zijn in tabel XV samengevat.

Inactivering van C'_3 of C'_4 heeft dus geen invloed op het remeffect. Nadat dit is aangetoond, hoeft C'_2 niet meer onderzocht te worden, omdat dit niet gebonden kan worden wanneer C'_4 geinactiveerd is. Omdat uitschakeling van C'_4 geen invloed heeft, zal C'_2 dus ook geen rol spelen bij de remming. Alleen het C'_1 blijft dus over als voor de remming verantwoordelijke component.

Om dit te bevestigen kan nog een meer specifieke inactivering van C'_1 worden uitgevoerd. Dit kan gebeuren door verhitting op 56° C of door onttrekking van het voor de binding van C'_1 nodige Ca^{2+}, b.v. door verseen (aethyleendiamino-tetra-azijnzuur).

De thermolabiliteit van de remmer is al aangetoond en was min of meer het uitgangspunt van onze proefnemingen. Het effect van verseen werd nagegaan door de directe proef met 0,1 ml van een na inactivering positief serum, maar zonder warmtebehandeling, èn de

Tabel XV

Invloed van C_3' en C_4' op de remming

Serum	Agglutinatiepatroon									
Directe proef*										
Serum Du	±	(+)	1	2	1	±	±	-	-	-
idem na inact. C_4'	±	-	1	1	1	±	±	-	-	-
Indirecte proef**										
0,1 ml pos. serum	2	2	2	2	2	1	(+)	-	-	-
0,1 ml pos. serum + 0,5 ml neg. serum	(+)	(+)	1	1	2	2	±	-	-	-
idem na inact. C_3'	-	-	±	±	2	2	±	-	-	-
idem na inact. C_4'	±	(+)	1	1	2	2	±	-	-	-

* Hiervan in het geheel 5 proeven gedaan met verschillende sera
** Hiervan in het geheel 3 proeven gedaan met verschillende sera

indirecte proef met 0,1 ml positief serum + 0,5 ml negatief serum te doen in een milieu waaraan het di-Na-zout van verseen was toegevoegd tot een eindconcentratie van 0,013 M. Eerst werd met gewone positieve sera nagegaan of deze concentraties de latexproef stoorden, hetgeen niet het geval bleek te zijn. Enkele uitkomsten van de proeven zijn samengevat in tabel XVI. In het geheel werden 18 van deze proeven gedaan met geheel overeenkomstig resultaat.

Tabel XVI

Invloed van verseen op de remming

Serum	Directe proef		Indirecte proef		
	Titer na inact.	Titer zonder inact. in 0,013 M verseen	0,1cc positief serum	Titer zonder verseen	Titer met 0,013 M verseen
			zonder neg.ser.	8/160	8/160
1	5/80	4/40	+0,5cc neg.ser.a	neg.	5/160
2	9/320	8/320	+0,5cc neg.ser.b	neg.	5/80
3	7/160	5/80	+0,5cc neg.ser.c	neg.	5/80
4	8/160	6/160	+0,5cc neg.ser.d	neg.	5/80

Inderdaad heft dus verseen het remmend effect van toegevoegd negatief serum of van het in serum zelf aanwezige bestanddelen op, zowel in de directe als in de indirecte proeven. Pogingen om het remmend effect weer terug te krijgen door toevoeging van Ca^{2+} mislukten echter. Dit is een onverklaard punt, dat een verzwakking van de bewijsvoering inhoudt. De aanwezigheid van allerlei kleine ionen en moleculen kan echter een invloed op het agglutinatiepatroon hebben, die niet altijd gemakkelijk te verklaren is (vgl. bijvoorbeeld de invloed van glycine of boraat op het inactiveringseffect; zie hoofdstuk II) en die voor dit geval nog niet nader werd uitgezocht. Het is niettemin waarschijnlijk geworden dat C_1' het remmende bestanddeel in menselijk serum is.

5. Discussie

Op de in hoofdstuk I gestelde vraag naar de aard van de remmer kan nu het antwoord worden gegeven, dat de remmer naar alle waarschijnlijkheid de eerste component van het complementsysteem is. Dit is in overeenstemming met de veronderstelling van Schubart, maar niet met die van Brine e.a., die meenden dat C_2' en C_4' bij de remming zouden zijn betrokken. Al deze auteurs hebben hun waarnemingen echter gedaan aan het latexsysteem volgens Singer en Plotz, waarvan het door ons gebruikte systeem zich door een grotere gevoeligheid onderscheidt. Aan de andere kant kan men zich moeilijk voorstellen dat hierbij een fundamenteel ander remsysteem zou werken. In ieder geval geven onze proeven geen steun aan de opvatting van Singer dat verschillende serum-eiwitten door aspecifieke adsorptie als beschermcolloïd zouden werken en zo een remmende invloed zouden hebben op de agglutinatie.

Wel kan men zeggen dat de remmer inwerkt op het substraat en niet op de agglutinator. Bernhard e.a. (8) vonden evenals wij een adsorptie van complement door latex-γ-globulinecomplexen en veronderstelden ook een remming van de latexproef door het complementsysteem. Zij isoleerden echter het complex van latex-γ-globuline met de remmer niet, maar voegden remmend en agglutinerend serum tesamen bij het latex-γ-globuline, waardoor het mechanisme onzeker blijft.

Hoewel remmer en agglutinator beide met het latex-γ-globulinecomplex reageren, treedt er waarschijnlijk toch geen competitie

om een zelfde bindingsplaats op. Dit wordt aannemelijk gemaakt door de proeven waarbij na reductie van het γ-globuline geen remmer of complement, maar wel R.A. factor door het latex-γ-globuline kon worden geadsorbeerd, en indirect ook door de waarneming dat dit complex na verzadiging met R.A. factor nog bijna evenveel complement kon binden als er voor. De verminderde adsorptie van R.A. factor door het latex-γ-globulinecomplex na voorafgaande opname van de remmer wijst echter wel op een zekere wederzijdse beinvloeding.

Het aannemen van verschillende bindingsplaatsen voor agglutinator en remmer is ook beter in overeenstemming te brengen met het optreden van het prozoneverschijnsel. Immers bij verdunning worden de concentraties van remmer en agglutinator in dezelfde verhouding verlaagd, zodat bij competitie om een zelfde bindingsplaats de situatie niet ten gunste van de agglutinator kan veranderen. Men moet dan ondanks de belemmering van de adsorptie van de R.A. factor door de remmer, toch verschillende bindingsplaatsen en bovendien reacties van verschillende orde aannemen. Om de belemmering van de reactie met de R.A. factor te verklaren, zou men dan moeten veronderstellen dat deze bindingsplaatsen naburig zijn, zodat b.v. sterische hindering kan optreden. Onze proeven brengen de oude vraag weer naar voren in hoeverre de R.A. factor deel uitmaakt van het complementsysteem. Ondanks de aangetoonde interactie moet de R.A. factor toch buiten dit systeem worden geplaatst. De mogelijkheid van naburige bindingsplaatsen wordt gesteund door de proeven van Taranta en Franklin (68), die binding van complement aan Porterfragment III van het γ-globuline veronderstelden, aan welk fragment zich ook de R.A. factor bindt (Goodman, 29; Franklin, 26).

Heimer e.a. (35) vonden anders dan wij een vrijwel volledige belemmering van de complementbinding aan latex-γ-globuline door voorafgaande binding van de R.A. factor. Voorafgaande binding van complement had echter slechts een geringe invloed op de binding van de R.A. factor. Zij gebruikten caviaserum als bron van complement, en vonden hiermee ook een gedeeltelijke remming van de latex-fixatieproef. Prozones traden hierbij echter niet op. Zij verklaarden hun proeven door verschillende bindingsplaatsen voor R.A. factor en complement aan te nemen, zij het met interactie. Hoewel het de vraag is of hun proeven niet beter door competitie

kunnen worden verklaard, is er toch een zekere overeenkomst met onze resultaten. Heimer en medewerkers gingen echter niet in op de thermolabiele remmer in menselijke sera, waarop het eigen onderzoek juist werd gericht. Onze proeven, die slechts een geringe wederzijdse beïnvloeding van de binding van R.A. factor en complement aantoonden, passen beter dan Heimer's proeven bij het hier voorgestelde model van de remmer als deel van het complementsysteem met een verschillende maar naburige bindingsplaats op het γ-globuline.

Het hier beschreven onderzoek kan geenszins als afgesloten worden beschouwd. Afgezien van de reeds genoemde onzekerheid ten aanzien van het effect van verseen en Ca^{2+}, is er ook nog geen enkel verband gelegd met de electrophoretische karakterisering van remmende factoren door Rantz e.a. (60) en door Deicher (15). Deze laatste onderzoeker vond zowel in de langzame γ- als in de α-fractie van menselijk serum bestanddelen met een remmende werking op de latex-fixatieproef. Dit zou er op wijzen, dat er meer dan één remmer is. Verder onderzoek zou het verband van deze remmers met het complementsysteem moeten aantonen. Rantz en medewerksters vonden remmers in dezelfde fracties als Deicher, maar konden de remming alleen aantonen wanneer de te onderzoeken fracties tegelijk met het γ-globuline aan de onbeklede latex werden toegevoegd, d.w.z. vóór het agglutinerend serum. Deze proefopstelling kan niet als een model voor het optreden van het prozone-effect gelden. De door Franklin (27) beschreven remmer van de Waaler-Roseproef werkt in een verschillend systeem en is bovendien thermostabiel, zodat we hier met een geheel ander bestanddeel te maken hebben.

HOOFDSTUK V

ISOLERING EN ONDERZOEK VAN EEN THERMOLABIELE AGGLUTINERENDE FRACTIE

1. Inleiding

In hoofdstuk I is besproken dat bij een wijziging van de proefomstandigheden (incubatie bij $\leq$ 37° C i.p.v. bij 56° C) alle sera in de latexproef positief worden. Nadat in hoofdstuk II werd aangetoond dat het hierbij betrokken serumbestanddeel in tegenstelling tot de β_{2M}-globulinen niet reduceerbaar is, zal nu nader worden ingegaan op de aard van deze component. Het lijkt immers van belang te weten of ook deze reactie veroorzaakt wordt door een immuunglobuline, of dat hier een geheel ander systeem een rol speelt. Wanneer ook hierbij een immuunglobuline zou zijn betrokken, zou daarmee een nieuw, zeer algemeen voorkomend systeem van anti-γ-globuline-antilichamen zijn gevonden.

Behalve de weerstand tegen reductie is er nog een karakteristieke eigenschap, die een onderscheid met de β_{2M}-globulinen mogelijk maakt, n.l. de thermolabiliteit die reeds in de proeven van Valkenburg (71) tot uiting kwam. Wanneer de sera van te voren 20' op 56° C worden verhit, treedt daarna de latexagglutinatie bij 37° C of bij kamertemperatuur niet meer op. Dit is vermoedelijk ook de reden dat de proef bij 56° C alleen de β_{2M}-agglutinatoren aantoont.

In 1961 beschreven Taranta e.a. (69) eeń serumfactor die in normale sera voorkomt en met geaggregeerd γ-globuline neerslaat. Door elutie van deze neerslagen met 0,3 M phosphaatbuffer van pH = 5,3 konden zij een thermolabiel eiwit met een sedimentatieconstante van 10,5 S verkrijgen, dat voor de reactie verantwoordelijk zou zijn. Müller-Eberhard en Kunkel (56) beschreven ook een dergelijke component met een sedimentatieconstante van 11 S, die

de electrophoretische beweeglijkheid had van een langzaam γ-globuline, maar immunologisch niet met 7 S immuun-γ-globuline verwant was. Zij veronderstelden dat deze component deel uitmaakte van het complementsysteem. De eigenschappen van deze fractie komen overeen met die van het serumbestanddeel dat in ons proefsysteem de agglutinaties bij 37° C en lager veroorzaakt. Het onderzoek werd er dan ook op gericht een eventuele identiteit van de in ons systeem werkzame factor met het 11 S-eiwit van Taranta en Müller-Eberhard vast te stellen.

2. Isolering van de agglutinerende factor

Getracht werd de agglutinerende factor uit het neerslag met latex-γ-globuline te elueren met de buffer die ook door Taranta e.a. was gebruikt. 2 ml Dow latex (28,6 % vaste stof) werd tot 10 ml verdund met gedestilleerd water. Deze suspensie werd gemengd met 90 ml 1 % menselijk γ-globuline in standaardbuffer. ½ uur later werd de latex-γ-globuline afgecentrifugeerd op 15000 t/min (20.000 g) gedurende 45' in de Spinco 1-rotor 40. Het neerslag werd met wat standaardbuffer opgeroerd en samengebracht met 15 ml van een mengsel van normale sera die negatief waren in de gewone en geïnactiveerde latexproef. Deze suspensie werd eerst 1½ uur bij 37° C gezet en daarna 1 nacht bij kamertemperatuur. De volgende dag bleek het mogelijk de enigszins geagglutineerde latex in een tafelcentrifuge af te draaien. Het neerslag werd 9 x met standaardbuffer gewassen en daarna 2 x met 7 ml 0,3 M phosphaatbuffer van pH = 5,3 geëlueerd. Hierna werd 30' op 15000 t/min in de Spinco 1 gecentrifugeerd bij 4° C. De gezamenlijke eluaten werden geneutraliseerd en geconcentreerd tot ongeveer 1 ml door ultrafiltratie. Het geconcentreerde eluaat werd in zijn geheel onderzocht in de ultracentrifuge, en in de latexproef met incubatie bij 37° C.

In een 5-tal proeven met verschillende mengsels van normale sera werd telkens een karakteristiek topje (zie fig. 12 A) in het ultracentrifugediagram waargenomen, dat in de blancoproef (0,9 % NaCl i.p.v. serum) niet voorkwam. De volgende tabel (XVII) geeft een overzicht van de gevonden titers en S-waarden. Hierbij zijn ook uitkomsten opgenomen die verkregen werden door een deel van

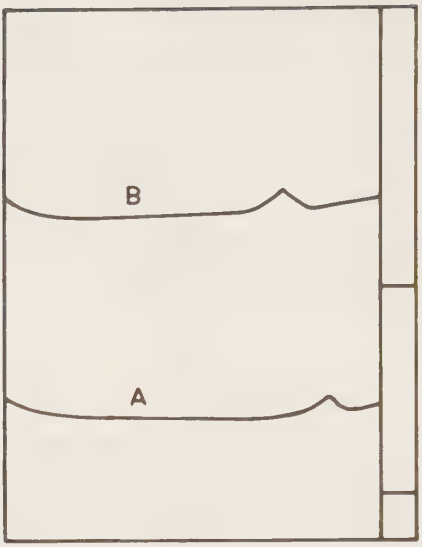


Fig. 12

Ultracentrifugediagram van eluaten van met serum behandelde latex-γ-globulinecomplexen.
A: elutie van de 10 S factor bij pH = 5,5
B: elutie van de R.A. factor bij pH = 3,0
Sedimentatie van rechts naar links.

Tabel XVII

Eigenschappen en latexagglutinaties van bij 37° C agglutinerende serumbestanddelen

Proef	Latexagglutinatietiter van eluaat	Behandeling van het eluaat	Titer na behandeling	S_{20}	S_{20} na behandelin
1	> 20/10240	geen		9,7	
2	> 20/10240	geen		8,4	
3	> 20/10240	30 min. op 56°	negatief	6,8	top verdwen
4	> 20/10240	1 min. op 56°	14/2560	10,2	top kleiner
5	> 20/10240	18 uur 0,02 M mercaptoethanol	17/10240	9,6	S dezelfde onveranderd

het eluaat te verhitten op 56° C gedurende verschillende tijden (proef 3 en 4), of gedurende 18 uur te behandelen met 0,02 M 2-mercaptoaethanol (proef 5).

Blanco proeven waren steeds negatief evenals de laatste porties wasbuffer. De lagere S-waarden in proef 2 en 3 gingen samen met uitkristalliseren van zouten tijdens de ultrafiltratie en blijkens het ultracentrifuge-diagram met de aanwezigheid van licht materiaal. Het zout is vermoedelijk secundair phosphaat, dat in de koude al gauw uitkristalliseert wanneer het niet snel genoeg wegdialyseert bij gebruik van een minder goede membraan. Een modelproef werd gedaan door 40 ml 0,3 M secundair phosphaat op dezelfde manier te ultrafiltreren, waarbij inderdaad een kristalbrij overbleef. Deze werd in 3 ml 0,9 % NaCl opgenomen en de viscositeit bij 20° C bepaald met de viscosimeter van Ostwald. Gevonden werd η = 1,25 t.o.v. 0,9 % NaCl. De dichtheid ρ, bepaald met de pyknometer, was 1,059 voor het concentraat van secundair phosphaat en 1,013 voor de 0,9 % NaCl. Corrigeert men S voor de gevonden η en ρ met behulp van de formule:

$$s_{20,z} = s_{20,p} \frac{\eta_{20,p}(1 - V_{20,z} \cdot \rho_{20,z})}{\eta_{20,z}(1 - V_{20,p} \cdot \rho_{20,p})}$$

waarin de index 20 de temperatuur, en de indices z en p de waarde in 0,9 % NaCl of phosphaatbuffer aangeven, dan neemt de waarde van s toe van 6,8 tot 9,7, onder aanname dat het partiëel specifiek volumen $V_{20,z} = V_{20,p} = 0,75$ (zie Jahnke en Scholtan, 40). Hiermee is aangetoond, dat een dergelijke correctie althans van de juiste grootte-orde is. Ter bevestiging werd bij een van de volgende proeven (no. 5) voor de ultrafiltratie eerst een nacht zonder druk tegen 0,9 % NaCl gedialyseerd om kristallisatie van secundair phosphaat bij de daaropvolgende ultrafiltratie te voorkomen. Deze proef leverde voor s de waarde 9,6 op.

Fig. 12 B toont het resultaat van een elutie van een neerslag van latex-γ-globuline met de R.A. factor met behulp van 0,1 M glycinebuffer van pH = 3,0. Een macroglobuline met een sedimentatiecoëfficiënt van 18 S wordt bij deze pH uitgewassen. Bij pH = 5,3 laat de R.A. factor niet van het γ-globuline los, in tegenstelling tot de 10 S component.

Deze uitkomst is enigszins onverwacht, omdat herhaaldelijk is

beschreven dat de R.A. factor bij pH = 5,5 kan worden geëlueerd van antigeen-antilichaamcomplexen (36,64). Volgens Heimer e.a. (35) kan de R.A. factor bij deze pH ook van onoplosbaar, gedenatureerd γ-globuline worden losgemaakt. Dit laatste kon echter door ons niet worden bevestigd (45).

3. Verdere karakterisering van de agglutinerende factor

We kunnen dus wel aannemen dat de sedimentatiecoëfficiënt van de door ons geïsoleerde component ongeveer 10 S is, en dat deze component verantwoordelijk is voor de agglutinatie bij $\leq$ 37° C. De geïsoleerde component blijkt thermolabiel en niet reduceerbaar te zijn en dus dezelfde eigenschappen te hebben als bij het overeenkomstige serologische verschijnsel worden gevonden. Immunodiffusie- en electrophoreseproeven gaven alleen een zeer geringe reactie met anti-γ-globuline, veel zwakker dan verwacht kon worden, wanneer het ultracentrifugetopje een γ-globuline zou zijn. Deze lijn kwam echter in gelijke mate ook in de blanco proeven voor en is dus waarschijnlijk afkomstig van γ-globuline, dat van de latexdeeltjes losgelaten heeft. Met anti-β_{2M}- en anti-β_{2A}-globuline traden geen reacties op.

Om deze agglutinerende factor ook electrophoretisch te karakteriseren is de tot nu toe gebruikte elutiemethode minder geschikt, omdat de eiwit-opbrengst niet hoog is. Een techniek die wel gevoelig genoeg is voor de verkregen hoeveelheden is de immuno-electrophorese, die echter geen ondubbelzinnige conclusies toelaat, omdat het γ-globuline-karakter van de gevonden component bewezen noch uitgesloten kan worden. Daarom werd getracht de agglutinerende activiteit in een fractie van de preparatieve zetmeelelectrophorese terug te vinden. De zetmeelblokelectrophorese werd uitgevoerd zoals in hoofdstuk III 2.3 is beschreven.

Het electropherogram werd in 6 fracties verdeeld zoals in figuur 13 is aangegeven, en elke fractie werd tot 1 ml geconcentreerd en daarna in 2 gelijke delen verdeeld, waarvan het ene deel bij 37° C in de latexproef werd geïncubeerd en het andere deel bij 56° C.

In tabel XVIII zijn de uitkomsten van deze proeven samengevat.

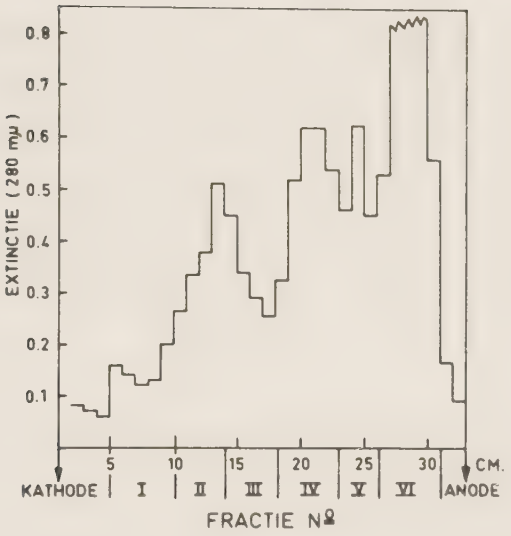


Fig. 13

Scheiding van normaal serum door electrophorese in een zetmeelblok.

Tabel XVIII

Onderzoek van electrophoresefracties

Fractie No.	Agarelectrophorese	Latextiter bij 37° C	Latextiter bij 56° C
I	geen eiwit	-	-
II	langzame γ	-	4/40
III	snelle γ	-	(+)
IV	β-α_2	4/40	-
V	α_1 + albumine	(+)	-
VI	albumine	-	-

In 3 proeven werd steeds een agglutinatie waargenomen bij 37° C, en niet bij 56° C, met fracties, afkomstig uit het α_2-β_1 gebied. In een van deze proeven werd een thermostabiele agglutinatie gevonden met de β_2-fractie, welke agglutinatie vermoedelijk afkomstig is van een β_{2M}-agglutinator die met de gewone latexproef niet in dit proefserum werd aangetoond, maar hier door concentratie tevoorschijn komt (zie ook hoofdstuk III, 3.3 en 6). Duide-

lijk blijkt de verschillende localisatie van de beide agglutinerende factoren in het electropherogram. Deze localisatie wijkt dus af van die van Müller-Eberhard en Kunkel, die vonden dat hun component de beweeglijkheid van een langzaam γ-globuline had.

Om een bevestiging hiervan te krijgen, werden enkele sera gechromatografeerd over DEAE-cellulose, met een gradiënt-elutieschema volgens Fahey e.a. (21), waarmee bij aflopende pH en oplopende ionensterkte eerst het γ-globuline uit de zuil komt en daarna de β- en de α-globulinen tesamen met het albumine. Deze chromatografie werd als volgt uitgevoerd:

Een zuil van 25 cm lengte en 1 cm inwendige diameter werd gevuld met DEAE-cellulose (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, capaciteit 0,52 maeq./g), dat van te voren in evenwicht was gebracht met 0,01 M phosphaatbuffer van pH = 8,0. Van een normaal menselijk serum dat vóór en na inactivering negatief was in de latexproef, werd 1,5 ml tesamen met wat DEAE-cellulose gedurende 2 dagen tegen de beginbuffer gedialyseerd en daarna op de zuil gebracht. Vervolgens werd geëlueerd met een pH- en zoutsterktegradiënt, verkregen door 150 ml eindbuffer (0,3 M primair phosphaat, pH = 5,0) uit een Erlenmeyerkolf in een rondbodemkolf te hevelen, waarin zich 250 ml beginbuffer (0,01 M phosphaatbuffer, pH = 8,0) bevond. In deze rondbodemkolf werden de buffers met een magnetische roerder gemengd en het mengsel overgeheveld naar de zuil. Op deze wijze kon een tamelijk reproduceerbaar chromatogram worden verkregen (zie fig. 14).

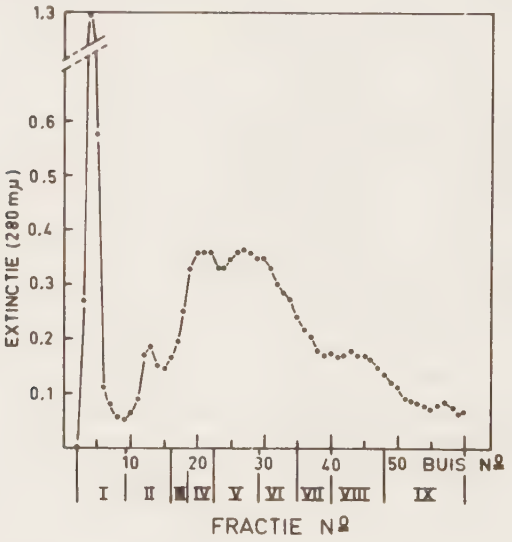


Fig. 14

Scheiding van normaal serum door chromatografie over DEAE-cellulose.

Bij 3 proeven met verschillende negatieve sera werd de activiteit niet aangetroffen in de z.g. doorbraakfractie (I), die de meeste γ-globulinen bevat, maar in fractie IV. Sporen γ-globuline zijn echter met immuno-electrophorese in vrijwel het gehele chromatogram aan te tonen, hoewel in de doorbraakfractie juist het langzame γ-globuline wordt aangetroffen. Macroglobulinen van het β_{2M}-type komen, anders dan hun electrophoretische eigenschappen zouden doen verwachten, pas achterin het chromatogram uit de zuil, en dit zou ook het geval kunnen zijn met de 10 S component. In ieder geval kan men zeggen dat de in het chromatogram gevonden localisatie eerder wijst op een α_2-β_1-globuline dan op een langzaam γ-globuline, al is dit laatste niet uit te sluiten.

4. Het verband van de agglutinerende factor met het complementsysteem

Uit de hiervoor beschreven proeven volgt dat de door ons gevonden 10 S component waarschijnlijk geen immuunglobuline is. Wanneer deze component inderdaad identiek is met die van Taranta en Müller-Eberhard, dan hoort hij thuis in het complementsysteem, waar hij als C_0' een plaats gevonden heeft vóór het C_1' (56). Volgens Barbaro (6) wordt het C_0' geadsorbeerd aan antigeen-antilichaamcomplexen, ook in aanwezigheid van verseen, dit laatste ter onderscheiding van C_1'. Om de identiteit van onze agglutinator met het C_0' verder te bevestigen, werd deze adsorptie nader onderzocht. Ovalbumine-antiovalbuminecomplexen werden gemaakt zoals in hoofdstuk IV, 4.2. beschreven is. Het immuunprecipitaat uit 0,35 ml van te voren geïnactiveerd konijnen-antiovalbumineserum werd samengebracht met 0,3 ml negatief menselijk serum met en zonder 0,013 M verseen. Na 24 uur staan werd het neerslag afgecentrifugeerd en de bovenlaag in de latexproef onderzocht bij 37° C incubatietemperatuur. De uitkomsten zijn voor één serum in tabel XIX weergegeven.
Deze uitkomsten werden met nog 5 andere sera bevestigd. Het blijkt dus dat de 10 S factor geadsorbeerd wordt aan het antigeen-antilichaamcomplex, ook in aanwezigheid van verseen, een eigenschap die ook de factor van Müller-Eberhard en Kunkel vertoont.

Dit bestanddeel is dus naar alle waarschijnlijkheid geen immuunglobuline en de bij 37°C en lager optredende agglutinatie is geen antigeen-antilichaamreactie. Dit is dus een wezenlijk onder-

Tabel XIX

Adsorptie van de 10 S factor aan antigeen-antilichaamcomplexen

Serumbehandeling	Verseen	Latextiter
0,1 ml. neg.serum	---	12/1280
idem	0,01 M	13/2560
idem na ads.	---	neg.
idem na ads.	0,01 M	1/20

scheid met de reacties van de R.A. factoren en van de in hoofdstuk III beschreven β_{2M}-globulinen.

Men kan zich afvragen, in welk verband de 10 S factor staat tot het remmend effect in de latexproef bij 56° C, waarvan in hoofdstuk IV is aangetoond dat het waarschijnlijk door C_1' wordt veroorzaakt. Voor de binding van C_1' zou C_0' noodzakelijk zijn. Aan de andere kant wordt de 10 S factor kennelijk onwerkzaam gemaakt bij de gewone uitvoering van de latexproef bij 56° C, terwijl de remmer onder deze omstandigheden wel zijn werking uitoefent. Misschien worden niet agglutinerende hoeveelheden 10 S factor toch in voldoende mate gebonden om remming door C_1' mogelijk te maken. De 10 S factor zelf remt niet, zoals blijkt uit de latex-agglutinatieproeven, uitgevoerd in aanwezigheid van 0,013 M verseen. Bij deze concentratie van verseen wordt de thermolabiele remming opgeheven (hoofdstuk IV 4.5.), maar de thermolabiele agglutinaties gaan onveranderd door, zoals tabel XIX laat zien.

Het verband tussen de 10 S factor en de remmer wordt nog verduidelijkt door proeven met gereduceerd γ-globuline als substraat. In hoofdstuk IV 4.3. is aangetoond dat een complex van latex met gereduceerd γ-globuline noch complement noch de remmer kan binden.

Om na te gaan of dit voor de 10 S factor ook het geval is, werd een reductie van γ-globuline uitgevoerd zoals in hoofdstuk IV 4.3. is beschreven. Met dit γ-globuline beklede latexdeeltjes werden op de gewone wijze gebruikt voor de agglutinatieproef bij 37° C. Voor adsorptie uit 0,5 ml serum bleek tenminste 3 ml latexsuspensie in verdunning 1:25 (hoofdstuk IV 3.2.) nodig te

zijn. De adsorpties werden uitgevoerd gedurende $1\,^1/_2$ uur bij 37° C en 18 uur bij kamertemperatuur, waarna de latex werd afgedraaid en de bovenlagen op de gebruikelijke wijze in de agglutinatieproef bij 37° C werden onderzocht. Uit tabel XX ziet men dat de 10 S factor slechts in zeer geringe mate kan worden gebonden, hetgeen zowel blijkt uit het verminderen van de agglutinaties bij 37° C als uit de veel geringere adsorptie van de factor aan latex met gereduceerd γ-globuline.

Tabel XX

Reactie van de 10 S factor met gereduceerd γ-globuline

Serum	Titer met	
	onbehandeld γ-globuline	gereduceerd γ-globuline
T	10/640	3/40
S	11/640	(+)
L	13/1280	3/40
R	13/1280	4/80
H	13/1280	2/40
B	11/640	4/40

	Titer voor ads.	Titer na adsorptie met	
		onbehandeld γ-globuline	gereduceerd γ-globuline
70	12/1280	neg.	9/320
80	10/640	neg.	9/320
110	10/640	neg.	9/320

5. D i s c u s s i e

De latexagglutinatie bij 37° C of kamertemperatuur blijkt veroorzaakt te worden door een serumbestanddeel met een sedimentatiecoëfficiënt van ongeveer 10 S en een electrophoretische beweeglijkheid in het α_2-γ_1 gebied. De factor is thermolabiel, niet

reduceerbaar en kan geadsorbeerd worden aan een immuunprecipitaat, ook in aanwezigheid van verseen. Alleen de electrophoretische beweeglijkheid onderscheidt de door ons gevonden factor van die van Taranta e.a. en Müller-Eberhard. Verder is de gelijkenis van dien aard, dat we hier waarschijnlijk toch met hetzelfde serumbestanddeel te maken hebben. De afwijkende uitkomsten bij de electrophorese zouden kunnen worden veroorzaakt door een andere pH bij de uitvoering van de proef. Deze wordt door Taranta e.a. en door Müller-Eberhard niet vermeld. In een recent onderzoek van Morse en Christian (54), die de 10 S factor ook in het langzame γ-gebied vonden, werd de electrophorese bij pH = 7,0 uitgevoerd. Door ons werden geen proeven bij deze pH gedaan. Een andere mogelijkheid is dat de 10 S factor in serum als onderdeel van een labiel macromoleculair complex voorkomt, dat een andere lading zou kunnen hebben (51). Dit complex zou onder invloed van nader te definiëren omstandigheden uiteen kunnen vallen. Beide mogelijkheden zouden nader moeten worden onderzocht.

Zowel de bindingsplaats voor de remmer als die voor de 10 S factor worden door reductie onwerkzaam gemaakt, wat te verwachten zou zijn als deze laatste factor inderdaad bij het complementsysteem hoort. Opmerkelijk is dat bij een uitvoering van de latexproef bij 37° C in reducerend milieu de agglutinatie wel doorgaat, zoals in hoofdstuk II.3. werd aangetoond. Blijkbaar wordt onder deze omstandigheden de structuur van het γ-globuline niet voldoende gewijzigd om de thermolabiele agglutinatie onmogelijk te maken.

Op twee punten moet nog de aandacht worden gevestigd. Ten eerste is duidelijk naar voren gekomen dat een agglutinerend systeem zoals hier gebruikt is, niet alleen antilichamen, maar ook andere reagerende bestanddelen kan aantonen. Verder blijkt het complementsysteem zowel een agglutinator (C'_0) als een remmer (C'_1) van hetzelfde proefsysteem te bevatten, die echter hun werking onder verschillende omstandigheden uitoefenen. Dit zou consequenties kunnen hebben voor de specificiteit van proeven, zoals die van Dulong de Rosnay e.a. (18) en de verschillende z.g. "slide-tests", die bij kamertemperatuur worden uitgevoerd.

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Met een gevoelige modificatie van de latex-fixatieproef kunnen agglutinatoren worden aangetoond in ongeveer 60 % van normale menselijke sera, wanneer deze van te voren 30 minuten op 56° C zijn verhit.

Uit het in dit proefschrift beschreven onderzoek is gebleken, dat deze reactie niet het gevolg is van de vorming van een artefact door verhitting, maar wordt veroorzaakt door een anti-γ-globulinefactor die behoort tot de β_2-macroglobulinen, evenals de R.A. factoren. Dit werd aannemelijk gemaakt, doordat kon worden aangetoond dat door preparatieve ultracentrifugering, zowel als door gelfiltratie een agglutinerende factor uit niet verhitte sera kan worden geïsoleerd. Deze factor is zowel bij deze technieken als bij preparatieve electrophorese alleen te vinden in die fracties, die het β_{2M}-globuline bevatten.

De aanwezigheid van anti-γ-globulinen met de eigenschappen van R.A. factoren in normale sera kan op twee manieren worden uitgelegd. Men kan stellen, dat de aanwezigheid van deze bestanddelen er op wijst, dat auto-immunisatie-processen tamelijk algemeen voorkomen. Men kan echter ook aannemen dat deze β_{2M}-globulinen, evenals de R.A. factoren, antilichamen zijn tegen γ-globuline, dat veranderd is door reactie met een antigeen, dus tegen het γ-globulinedeel van antigeen-antilichaamcomplexen. In het laatste geval zou dan geen sprake zijn van een fout in de "zelfherkenning", zoals bij de auto-immunisatie sensu stricto. Het experimenteel opwekken van R.A. factoren en het voorkomen van zulke factoren bij bepaalde chronische ziekten geven steun aan deze laatste opvatting. Onze proeven laten een keuze tussen de beide genoemde verklaringen echter niet toe. Wel is aangetoond dat R.A. factoren zeer algemeen kunnen voorkomen en dat het optreden van deze factoren bij rheumatoïde arthritis eerder een quantitatieve verandering is dan een qualitatieve.

Dat normale sera zonder voorbehandeling in de latex-fixatieproef in grote meerderheid negatief reageren, kan worden verklaard door het bestaan van een remmer van de agglutinatie in de-

ze sera aan te nemen. Ook in negatieve sera komt een dergelijke remmer voor. Deze remmer oefent zijn werking uit door adsorptie aan de met γ-globuline beklede latexdeeltjes.

Het kon aannemelijk worden gemaakt dat de remmer deel uitmaakt van het complementsysteem, omdat hij geadsorbeerd wordt aan antigeen-antilichaamcomplexen en aan met γ-globuline beklede latexdeeltjes, die beide in staat zijn om complement te binden. Voorafgaande reductie van het γ-globuline hief de complementbindende werking van het latex-γ-globulinecomplex op, evenals het vermogen om de remmer te adsorberen. De R.A. factor kon nog wel door gereduceerd γ-globuline worden gebonden. De remmer neemt dus vermoedelijk niet de plaats van de R.A. factor op het substraat in, hoewel hij de binding van deze factor wel bemoeilijkt. Door selectieve inactiveringen werd waarschijnlijk gemaakt dat het verantwoordelijke bestanddeel C_1' was.

De remming van de latex-fixatieproef vindt dus waarschijnlijk niet plaats door een niet-specifieke stabilisatie van de latexsuspensie door eiwitten die alleen als beschermcolloïd optreden, maar kan worden toegeschreven aan een bij immuunreacties betrokken systeem. De biologische betekenis hiervan zal nog nader moeten worden vastgesteld. De rol van deze remmer bij de z.g. inhibitieproeven voor rheumatoïde arthritis is nog niet duidelijk.

Een met alle onderzochte sera optredende latexagglutinatie bij kamertemperatuur of bij 37° C bleek van de hiervoor genoemde agglutinaties te verschillen, doordat het verantwoordelijke bestanddeel thermolabiel en niet reduceerbaar was. Deze factor werd geisoleerd en bleek een sedimentatiecoëfficiënt van ongeveer 10 S te hebben. De agglutinerende activiteit van de onderzochte sera was in het α_2-β_1-gedeelte van het electropherogram gelocaliseerd. De factor is geen immuunglobuline, maar is waarschijnlijk identiek aan de door Taranta e.a. en door Müller-Eberhard gevonden 11 S component, die hoort bij het complementsysteem (C_0'). De door ons gevonden electrophoretische localisatie verschilt echter van die van de genoemde auteurs. Dit bestanddeel is eveneens te adsorberen aan antigeen-antilichaamcomplexen, maar remt de agglutinaties door β_{2M}-globuline niet.

Over de biologische betekenis van deze factor valt nog weinig te zeggen. Wel moet met het voorkomen van deze agglutinator rekening worden gehouden bij modificaties van de latexproef die bij 37° C of lager worden uitgevoerd.

De drie in dit proefschrift onderzochte verschijnselen houden

voorlopig in biologisch opzicht nog geen duidelijk verband met elkaar. Hun gemeenschappelijke behandeling hier vloeit, althans ten dele, voort uit het feit dat ze alle drie in de latex-fixatieproef worden waargenomen. Verder onderzoek zal in de eerste plaats duidelijk moeten maken wat de biologische betekenis is van de hier onderzochte serumbestanddelen.

SUMMARY

A study has been made of agglutinators and inhibitors found by means of the latex fixation test. Using a sensitive modification of this test it is possible to detect a small agglutinating effect in 60 % of normal human sera after 30 minutes heating at 56° C. This was shown to be caused by a β_{2M}-globulin with the properties of a rheumatoid factor. The presence of this globulin was found to be concealed in the latex fixation test by the action of a thermolabile inhibitor, which had to be inactivated before the weak agglutinations could be demonstrated. The inhibitor acted on the γ-globulin with which the latex particles were coated. It is suggested that the inhibitor may be identical with the first component of the complement system. Its binding site is probably different from that of the rheumatoid factors, although a slight inhibition of binding of either component by the other was found.

Apart from these rheumatoid factor-like substances, another agglutinator could be demonstrated by the same latex fixation test, if a lower incubation temperature was used. It was present in every serum investigated. In contrast to the rheumatoid factors, this component was thermolabile and could not be reduced by mercapto-ethanol. It was possible to isolate the active component and to demonstrate its similarity to the 11 S-component which forms a part of the complement system (C_0'). The electrophoretic mobility was that of an α_2-β_1 globulin and differed from published observations which suggest that the component has the mobility of a slow γ-globulin.

The presence of rheumatoid factor-like substances in normal human sera can be interpreted to mean that auto-immunization phenomena occur very frequently. It is possible that these components arise as antibodies directed against the γ-globulin part of circulating antigen-antibody complexes resulting from various generally occurring infections. The biological significance of the in-

hibitors is not yet clear. However they may play a part in inhibition tests for the diagnosis of rheumatoid arthritis.

The existence of an 11 S-agglutinator has to be kept in mind when latex tests without incubation at 56° C are used. This component does not seem to be specific for rheumatoid arthritis.

LITTERATUUR

1. Abruzzo, J.L., C.L. Christian, J.Exp.Med., 114, 791 (1961).
2. Aho, K., Ann.Med.Exp.Biol.Fenniae, 39, Suppl. 7 (1961).
3. Aho, K., O. Wager, Ann.Med.Exp.Biol.Fenniae, 39, 79 (1961).
4. Ball, J., R. de Graaff, H.A. Valkenburg, F. Westendorp Boerma, Arthritis Rheumat., 5, 55 (1962).
5. Ball, J., J.S. Lawrence, Ann.Rheum.Dis., 20, 235 (1961).
6. Barbaro J.F., Nature, 199, 819 (1963).
7. Bartfeld, H., Ann.Internal Med., 52, 1059 (1960).
8. Bernhard, G.C., W. Cheng, D.W. Talmage, J.Immunol., 88, 750 (1962).
9. Bloemendal, H., Chromatogr.Rev., 2, 44 (1960).
10. Bonomo, L., J. Lospalluto, M. Ziff, Arthritis Rheumat., 6, 104 (1963).
11. Brine, K.L., R.J. Wedgwood, W.S. Clark, Arthritis Rheumat., 1, 230 (1958).
12. Charlwood, P.A., Persoonlijke mededeling.
13. Christian, C.L., J.Chronic Diseases, 16, 875 (1963).
14. Davis IV, J.S., A.J. Bollet, J.Immunol., 92, 139 (1964).
15. Deicher, H., Klin.Wochschr., 39, 612 (1961).
16. Deutsch, H.F., J.I.Morton, J.Biol.Chem. 231, 1107 (1958).
17. Doniach, D., I.M. Roitt, Ann.Rev.Med., 13, 213 (1962).
18. Dulong de Rosnay, C., P. du Pasquier, G. Moustardier, Ann. Inst.Pasteur, 95, 23 (1958).
19. Eyquem, A., N. Guyot-Jeannin, L. Podliachouk, Ann.Inst.Pasteur, 96, 295 (1959).
20. Fahey, J.L., Persoonlijke mededeling.
21. Fahey, J.L., P.F. MacCoy, M. Goulian, J.Clin.Invest., 37, 272 (1958).
22. Flodin, P., J. Killander, Biochim.Biophys.Acta, 63, 403 (1962).
23. Flodin, P., Dextran gels and their application in gel filtration, diss. Uppsala 1962.
24. Franklin, E.C., H.R. Holman, H.J. Müller-Eberhard, H.G. Kunkel, J.Exp.Med., 105, 425 (1957).
25. Franklin, E.C., H.G. Kunkel, H.J. Müller-Eberhard, H.R. Holman, Ann.Rheum.Dis., 16, 315 (1957).

26. Franklin, E.C., Atti Congr. Intern. Lega Reumat. ed. Minerva Medica, Rome 1961, vol. II, p. 804.
27. Franklin, E.C., Arthritis Rheumat., 3, 314 (1960).
28. Fudenberg, H.H., H.G. Kunkel, J.Exp.Med., 114, 257 (1961).
29. Goodman, J.W., Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 106, 822 (1961).
30. Gray, J.D., J. Immunol., 83, 1 (1959).
31. Grubb, R., B. Swahn, Acta Pathol.Microbiol.Scand., 43, 305 (1958).
32. Hammack, W.J., H.L. Holley, J.Lab.Clin.Med., 58, 366 (1961).
33. Heimer, R., E.R. Schwartz, R.H. Freyberg, J.Lab.Clin.Med., 57, 16 (1961).
34. Heimer, R., F.M. Levin, E. Rudd, Am.J.Med. 35, 175 (1963).
35. Heimer, R., F.M. Levin, M.F. Kahn, J.Immunol., 91, 866 (1963).
36. Heimer, R., O.M. Federico, R.H. Freyberg, Proc.Soc.Exp.Biol. Med., 99, 381 (1958).
37. Heller, G., A.S. Jacobson, M.H. Kolodny, W.H. Kammerer, J. Immunol., 72, 66 (1954).
38. Ishizaka, T., K. Ishizaka, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 101, 845 (1959).
39. Ishizaka, T., K. Ishizaka, T. Borsos, J.Immunol., 87, 433 (1961).
40. Jahnke, K., W. Scholtan, Die Bluteiweisskörper in der Ultrazentrifuge, G. Thieme, Stuttgart, 1960.
41. James, K., D. Felix-Davies, D.R. Stanworth, Ann.Rheum.Dis., 20, 369 (1961).
42. Kabat, E.A., M.M. Mayer, Experimental Immunochemistry, 2e ed., Ch.C. Thomas, Springfield 1961.
43. Klein, F., P. Mattern, ongepubliceerd.
44. Klein, F., H. Radema, ongepubliceerd.
45. Klein, F., T.L. van Zwet, ongepubliceerd.
46. Kritzman, J., H.G. Kunkel, J. MacCarthy, R.C. Mellors, J.Lab. Clin.Med., 57, 905 (1961).
47. Kunkel, H.G., Arthritis Rheumat., 6, 414 (1963).
48. Kunkel, H.G., in F.W. Putnam, The Plasma Proteins, vol. I. Acad.Press, New York 1960, p. 294.
49. Levy, H.B., H.A. Sober, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 103, 250 (1960).
50. Lospalluto, J., M. Ziff, J.Exp.Med., 110, 169 (1959).
51. Lepow, I.H., geciteerd door H.J. Rapp en T. Borsos in: Science, 141, 738 (1963).
52. Mattern, P., F. Klein, W. Hijmans, H. Radema, Méd.Afrique Noire, 10, 241 (1963).

53. Milgrom, F., E. Witebski, R. Goldstein, U. Loza, J.Am.Med. Assoc., 181, 476 (1962).
54. Morse, J.H., C.L. Christian, J.Exp.Med., 119, 195 (1964).
55. Müller-Eberhard, H.J., Atti Congr. Intern. Lega Reumat. ed. Minerva Medica, Rome 1961, vol. II, p. 791.
56. Müller-Eberhard, H.J., H.G. Kunkel, Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 106, 291, (1961).
57. Nienhuis, R.L.F., E. Mandema, A. Jansz, Ann.Rheum.Dis., 22, 431 (1963).
58. Oreskes, I., J.M. Singer, J.Immunol., 86, 338 (1961).
59. Porath, J., P. Flodin, Protides Biol.Fluids, Proc.Colloq. 10, 290 (1962).
60. Rantz, L.A., E. Randall, D. Kettner, Arthritis Rheumat., 2, 104 (1959).
61. Scheidegger, J.J., Intern.Arch.Allergy Appl.Immunol., 7, 103 (1955).
62. Schubart, A.F., New Engl.J.Med., 261, 579 (1959).
63. Schulze, H.E., H. Haupt, K. Heide, G. Möschlin, R. Schmidtberger, G. Schwick, Z. Naturforsch., 17b, 313 (1962).
64. Simons, K., K. Aho, P. Seppälä, O. Wager, Clin.Chim.Acta. 9, 519 (1964).
65. Singer, J.M., C.M. Plotz, Am.J.Med., 21, 888 (1956).
66. Singer, J.M., G. Altmann, I. Oreskes, C.M. Plotz, Am.J.Med., 30, 772 (1961).
67. Szybalski, W., Experienta, 16, 164 (1960).
68. Taranta, A., E.C. Franklin, Science, 134, 1981 (1961).
69. Taranta, A., H.S. Weiss, E.C. Franklin, Nature, 189, 239 (1961).
70. Valkenburg, H.A., A.M. de Mos, Ned. Tijdschr.Geneesk., 103, 2305 (1959).
71. Valkenburg, H.A., ongepubliceerd.
72. Vaughan, J.H., J.Immunol., 77, 181 (1956).
73. Waaler, E., Acta Pathol.Microbiol.Scand., 17, 172 (1940).
74. Watson, R.G. J.Immunol., 91, 243 (1963).
75. Wiedermann, G., P.A. Miescher, E.C. Franklin, Proc.Soc.Exp. Biol.Med., 113, 609 (1963).
76. Wieme, R.J., Clin.Chim.Acta, 4, 317 (1959).
77. Williams Jr, R.C., H.G. Kunkel, J.Clin.Invest., 41, 666 (1962).
78. Ziff, M., P. Brown, J. Lospalluto, J. Badin, C. MacEwen, Am. J.Med., 20, 500 (1956).

Op verzoek van de Faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen volgt hier een kort overzicht van mijn academische studie en verdere loopbaan.

Mei 1942	Eindexamen Gymnasium β aan het toenmalig 2e Stedelijk Gymnasium te 's-Gravenhage.
September 1945	Inschrijving aan de Rijksuniversiteit te Leiden.
Mei 1949	Candidaatsexamen Wis- en Natuurkunde, letter f'
April 1954	Doctoraalexamen chemie met hoofdvak organische chemie en bijvakken biochemie en physische chemie. De studie voor dit examen stond onder leiding van de hoogleraren Dr. E. Havinga, Dr. H.G. Bungenberg de Jong, Dr. C.J.F. Böttcher, en van Dr. H.L. Booy.

Van juni 1954 tot mei 1956 werkte ik op het Unilever Research Laboratorium op organisch-chemisch gebied Van mei 1956 tot juni 1957 was ik als biochemicus verbonden aan het Nederlands Instituut voor Volksvoeding te Amsterdam. In juni 1957 volgde mijn benoeming tot biochemicus bij het Instituut voor Rheuma-onderzoek te Leiden, waar ik thans werkzaam ben.

Veel dank ben ik verschuldigd aan degenen, die een bijdrage hebben geleverd aan het tot stand komen van dit proefschrift.
Mej. G.J.M. Lafeber voerde zeer vele serologische proeven uit, en Mej. T.L. van Zwet had een groot aandeel in het chemische werk.
De Heer H. Radema werkte de preparatieve electrophorese voor serumeiwitten uit en was behulpzaam bij het ultracentrifuge-onderzoek.
De Bloedbank van het Academisch Ziekenhuis te Leiden (hoofd Dr. J.J. van Rood) leverde vele serummonsters voor het onderzoek.
Thanks are due to Dr. J.W. Vanderhoff, Dow Chemical Company, Midland, U.S.A. for a large gift of Dow Latex Suspension.
Het manuscript werd getypt door Mej. C.P.M.Th. Roeleveld en Mej. M.M. Krom. De Heer W.Th. van Weeren maakte de tekeningen en de Heer J.G.H. Fengler de reproducties.

STELLINGEN

1. De Rheumatoïde-Arthritisfactoren kunnen opgevat worden als antilichamen, welke worden opgewekt door het gammaglobuline-gedeelte van circulerende antigeen-antilichaamcomplexen.

   Dit proefschrift, blz. 46

2. Het is van belang het verloop van de latextiters in normale menselijke sera na voorafgaande inactivering te correleren met gelijktijdige veranderingen in de lichamelijke toestand van de betrokken personen.

   Dit proefschrift, blz. 46

3. De invloed van het antigeen op de vorming van β_{2M}-antilichamen verdient een nader onderzoek.

4. De uitkomsten van de proeven van Heimer e.a. over complement-binding van met R.A. factor verzadigde latex-gammaglobuline-complexen sluiten een mechanisme met één bindingsplaats voor R.A. factor en complement niet uit.

   R. Heimer, F.M. Levin, M.F. Kahn, J. Immunol., 91, 866, (1963)

5. Het bestaan van β_{2M}-paraproteinaemieën kan niet worden vastgesteld aan de hand van elutiediegrammen van gelfiltratie van de desbetreffende sera over Sephadex G-200.

   S.D. Roskes, T.E. Thompson, Clin. Chim. Acta, 8, 489, (1963)

6. In de litteratuur wordt onvoldoende aandacht besteed aan de noodzakelijkheid van een gelijktijdige serumblanco bij de bepaling van urinezuur in serum.

   Zie o.a. T.F. Yü, A.B. Gutman, Bull. Rheum. Dis., 7, suppl.no.5, (1957)
   L. Liddle, J.E. Seegmiller, L. Laster, J. Lab. Clin. Med., 54, 903, (1959)

7. De reduceerbaarheid van menselijk α_{2M}-globuline door 2-mercapto-aethanol is wellicht toe te schrijven aan een proteolytische ontsluiting van het molecuul onder invloed van thrombine en/of plasmine.

Dit proefschrift, blz. 32
H.E. Schulze, N. Heimburger, K. Heide, H. Haupt, K. Störiko, H.G. Schwick, Proc. 9th Congr. europ. Soc. Haemat., Lissabon 1963, p. 1315

8. De binding van één molecuul basische kleurstof op twee phosphaatgroepen in neutraal, zoutvrij milieu door nucleoproteïnen van zeer verschillende aard, hangt samen met een bijzonderheid in de structuur, die uit de bestaande modellen niet naar voren komt.

F. Klein, J.A. Szirmai, Biochim. Biophys. Acta, 72, 48 (1963)
A.R. Peacocke, Progress in Biophysics, 10, 55, (1960)

9. De door Chinn gegeven verklaring voor de samenstelling van de reductie-producten van de 17-keto-C/D cis- en transsteroïden is aanvechtbaar.

L.J. Chinn, J. Org. Chem., 27, 54, (1962)

10. Ten onrechte stelt Vernon dat het toepassen van het begrip energierijk phosphaat geleid heeft tot het invoeren van pseudomere reacties bij het beschrijven van biochemische processen.

C.A. Vernon, in: Size and Shape Changes of Contractile Polymers, Pergamon Press 1960, p. 109

11. Het doen van voorlopige mededelingen in de vaklitteratuur dient geen belang van wetenschappelijke informatie.

12. Het z.g. "ontsluiten" van natuurgebieden ten behoeve van de recreatie, door wegenaanleg e.d., ontneemt aan zulke gebieden de recreatieve waarde.